



Funktionelle Analyse und Dynamik der regulatorischen
Schaltkreise des TEA-Transkriptionsfaktors Tec1
in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sarah Weisser

aus Villingen-Schwenningen

Marburg/Lahn 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2011 bis November 2015 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 14.12.2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Lenz

Tag der mündlichen Prüfung am: 14.01.2016

Publikationen:

van der Felden, J., Weisser, S., Brückner, S., Lenz, P., Mösch, H.-U. (2014). The transcription factors Tec1 and Ste12 interact with coregulators Msa1 and Msa2 to activate adhesion and multicellular development. *Mol. Cell. Biol.* **34**:2283-2293.

Weisser, S., Brückner S., Lenz, Mösch, H.-U. (2015). Functional analysis and dynamics of regulatory circuits involving the TEA family transcription factor Tec1 in *Saccharomyces cerevisiae* (in Vorbereitung)

Zusammenfassung

Haploide Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* können abhängig von Umwelteinflüssen die beiden Differenzierungsprogramme Konjugation und adhäsives Wachstum ausführen. An dieser Regulation ist das hochkonservierte Fus3/Kss1-MAPK Modul beteiligt, welches die beiden Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 kontrolliert. Unter Konjugationsbedingungen wird das Adhäsions-spezifische Tec1 abgebaut, um eine ungewollte Aktivierung von Zielgenen der Adhäsion während der Konjugation zu verhindern. Jedoch finden sich in der Promotorregion von *TEC1*, neben Tec1-spezifischen Bindestellen (TCS-Elemente; „TEA/ATTS consensus sequence“) auch mögliche Bindestellen für Ste12 (PREs; „pheromone response elements“), die vermuten lassen, dass der *TEC1*-Promotor direkt durch Ste12 gebunden wird und die *TEC1*-Expression entgegen den Erwartungen unter Konjugationsbedingungen induziert wird. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die transkriptionelle und translationelle Regulation von Tec1 insbesondere durch Ste12 näher beleuchtet werden. Zunächst wurde untersucht, welche Rolle die Autoregulation und die Regulation durch Ste12 bei der Kontrolle der *TEC1*-Expression während verschiedener Differenzierungsprogramme spielen und ob ausgewählte Umweltsignale selektiv über einen bestimmten Regelkreis verarbeitet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von *TEC1* unter vegetativen und Konjugationsbedingungen hauptsächlich durch Ste12 über die PREs vermittelt wird, während die TCS-Elemente für eine effiziente Transkription nicht benötigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *TEC1*-Expression und Proteinstabilität durch verschiedene Nährstoffsignale beeinflusst wird. Ein Mangel an Glukose führte beispielweise zu erhöhten *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen, während Stickstoffmangel nur die *TEC1*-Transkription leicht induziert, die Tec1-Proteinstabilität aber negativ beeinflusst wird. Dabei zeigte sich auch, dass diese Nährstoffkontrolle vermutlich nicht über den TCS- oder PRE-vermittelten Regelkreis erfolgt, sondern über bislang noch unbekannte Mechanismen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der 3' untranslatierte Bereich (UTR, „untranslated region“) von *TEC1* vermutlich wichtig für die Kontrolle der *TEC1*-Translation durch das RNA-Bindeprotein Mpt5 zu sein scheint. Der dritte Teil der Arbeit beschreibt die erfolgreiche Entkopplung der *TEC1*-Expression von der Ste12-vermittelten Kontrolle durch eine synthetische, Doxyzyklin-vermittelte Kontrolle der Transkription. Es konnte gezeigt werden, dass die Ste12-Kontrolle der *TEC1*-Expression durch eine einzelne Bindestelle für einen Doxyzyklin-regulierten Aktivator ersetzt werden kann. Zudem zeigte sich, dass der aus dem humanen Cytomegalievirus stammende Promotor in *S. cerevisiae* vermutlich nicht effizient genug aktiviert wird, um eine für die Aktivierung der *TEC1*-Expression ausreichende Menge an Doxyzyklin-reguliertem Aktivator zu produzieren.

Summary

Haploid cells of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* can execute the two developmental programs mating and adhesive growth depending on environmental influences. The highly conserved Fus3/Kss1-MAPK module is involved in this regulation and controls the two transcription factors Tec1 and Ste12. During mating, the adhesion-specific Tec1 is degraded to prevent an undesired activation of target genes of adhesion during mating. However, the promoter of *TEC1* contains, amongst Tec1-specific binding sites (TCS-elements; TEA/ATTS consensus sequence) also potential binding sites for Ste12 (PREs; pheromone response elements) suggesting that the *TEC1*-promoter is directly bound by Ste12 and the *TEC1*-transcription is induced during mating contrary to the expectations. Therefore, the transcriptional and translational regulation of Tec1 particularly by Ste12 was investigated in the work presented here. First, the role of the autoregulation and the regulation by Ste12 in control of *TEC1*-expression during different developmental programs was analyzed and it was determined, if exclusive environmental signals are selectively processed by a specific regulatory circuit. Here it could be shown that the expression of *TEC1* during vegetative growth and mating is mainly controlled by Ste12 via the PREs whereas the TCS-elements are not required for an efficient transcription. Moreover, it could be shown that the *TEC1*-expression and protein stability is influenced by different nutritional signals. A lack of glucose for example led to increased *TEC1*-transcript and Tec1-protein levels, whereas nitrogen deprivation seemed to only slightly induce *TEC1*-transcription but Tec1-protein stability is negatively influenced. Here it was also shown that the control by nutrients is probably not processed by the TCS- or PRE-mediated regulatory circuit but by so far unknown mechanisms. In the second part of this study it could be shown that the 3' untranslated region (UTR) of *TEC1* is probably important for control of *TEC1*-translation by the RNA-binding protein Mpt5. The third part of this work describes the successful uncoupling of *TEC1*-expression from Ste12-mediated control by synthetic doxycycline-mediated control of transcription. It was shown that the control of *TEC1*-expression by Ste12 can be replaced by a single binding site for a doxycycline-regulated activator. Additionally, it was found that the promoter of the human cytomegalovirus is presumably not efficiently activated in *S. cerevisiae* to produce a sufficient amount of doxycycline-regulated activator which can subsequently activate *TEC1*-expression.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Maßeinheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem (SI; *Système internationale d'unités*) und den davon abgeleiteten Einheiten. Die Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt.

Abb.	Abbildung	mRNA	„messenger“ RNA
AD	Aktivierungsdomäne	NLS	„nuclear localization signal“
AMP	Adenosinmonophosphat	N-terminal	Amino-terminal
Amp	Ampicillin	OD	optische Dichte
APS	Ammoniumpersulfat	ORF	Offenes Leseraster
ATP	Adenosintriphosphat	P	Promotor
bp	Basenpaare	PAK	p21-aktiverbare Proteinkinase
BSA	bovines Serumalbumin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	PEG	Polyethylenglykol
cDNA	Komplementäre DNA	pH	„potentia Hydrogenii“
CFP	cyan fluoreszierendes Protein	PKA	Proteinkinase A
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
C-terminal	Carboxy-terminal	PP2A	Proteinphosphatase 2A
Cy 5.5	Cyan 5.5	PRE	„pheromone response elements“
DBD	DNA-Bindedomäne	psi	„pound-force per square inch“, Einheit
dH ₂ O	destiliertes Wasser	PUF	„ <u>P</u> umilio and <u>F</u> BF“
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease	(r)tetR	(reverser) Tetrazyklin-regulierbarer Repressor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	(r)tTA	(reverser) Tetrazyklin-Regulierbarer Transaktivator
DTT	Dithiothreitol	S	Svedberg, Einheit
ECL	„enhanced chemiluminescence“	SC	„Synthetic Complete“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift- Assay	T	Terminator
et al.	und andere	Tab.	Tabelle
FRE	„filamentation and invasion responsive element“	TAE	Tris-Acetat-EDTA
g	g-Kraft	TBE	Tris-Borat-EDTA
GDP	Guanosindiphosphat	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
GEF	„guanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor“	TCA	Trichloressigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TCS	„TEA/ATTS consensus sequence“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol	TE	Tris-EDTA
		TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
		tetO	Tet-Operatorsequenz

GTP	Guanosintriphosphat	TORK	TOR-Komplex
HA	Mämagglutinin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
hc	„high copy“	tRNA	transfer-RNA
HF	Hellfeld	Tween® 20	Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat
HOG	„high osmolarity glycerol“	U	Unit
hphNT1	Hygromycin B-Resistenzgen	UTR	„untranslated region“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	UV	ultraviolett
kb	Kilobasenpaare	v/v	„volume per volume“
LB	„Lysogeny Broth“	w/v	„weight per volume“
LFM	„Low Fluorescence Medium“	YEPD	„Yeast Extract, Peptone, Dextrose“
M	Molar	YEPG	„Yeast Extract, Peptone, Galactose“
MAPK	mitogen aktivierbare Proteinkinase	YFP	gelb fluoreszierendes Protein
MAT	„mating-type locus“	YNB	„Yeast Nitrogen Base“
MBP	Maltose bindendes Protein		
M-CAT	„muscle-CAT“		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus in der Molekularbiologie	1
1.2 Die zellulären Differenzierungsprogramme Konjugation und Adhäsion.....	3
1.2.1 Die Konjugation	3
1.2.2 Die Adhäsion.....	4
1.2.2.1 Das Fus3/Kss1-MAPK Modul	5
1.2.2.2 Der cAMP/PKA-Signalweg	9
1.2.2.3 Der Snf1/Glukose-Repressionsweg.....	10
1.2.2.4 Der TOR-Signalweg.....	11
1.2.2.5 Der generelle Aminosäurekontrollweg	13
1.3 Die Funktion und Struktur des Transkriptionsfaktors Ste12.....	14
1.4 Die Funktion und Struktur des Transkriptionsfaktors Tec1	15
1.5 Mechanismen der Zielgenkontrolle durch Ste12 und Tec1.....	19
1.6 Das Tetrazyklin-regulierte Expressionssystem	21
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	23
2 Ergebnisse.....	24
2.1 Transkriptionelle Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 unter Konjugationsbedingungen und verschiedenen Stressbedingungen.....	24
2.1.1 Identifizierung der PREs und TCS-Elemente im <i>TEC1</i> -Promotor.....	24
2.1.2 <i>In vitro</i> Interaktion von Tec1 und Ste12 am <i>TEC1</i> -Promotor	26
2.1.3 Effekt der mutierten TCS-Elemente und PREs auf die Flo11-abhängige Adhäsion an eine Agar-Oberfläche	28
2.1.4 Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 während der Konjugation	29
2.1.4.1 Die Pheromon-abhängige <i>TEC1</i> -Expression wird durch den Ste12-abhängigen Regelkreis vermittelt	29
2.1.4.2 Analyse der <i>TEC1</i> -Regulationsdynamik auf Einzelzellebene mittels CFP*-Reportergen	32
2.1.4.3 Analyse der <i>TEC1</i> -Regulationsdynamik auf Einzelzellebene mittels 3 × <i>mTurquoise 2</i> -Reportergen	35
2.1.5 Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 unter Glukosemangelbedingungen	40

2.1.6	Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 unter Stickstoffmangelbedingungen	43
2.1.7	Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 unter Aminosäuremangelbedingungen	48
2.1.8	Regulation der <i>TEC1</i> -Expression durch Tec1 und Ste12 bei osmotischem Stress.....	49
2.2	Translationelle Regulation der <i>TEC1</i> -Expression	51
2.3	Synthetische Regulation der <i>TEC1</i> -Expression.....	53
2.3.1	Die Kontrolle des <i>rtTA</i> über den Promotor des humanen Cytomegalievirus (<i>P_{CMV}</i>) ermöglicht nur eine schwache Expression von <i>TEC1</i>	53
2.3.2	Die Kontrolle des <i>rtTA</i> über den <i>STE12</i> -Promotor ermöglicht eine optimale Expression von <i>TEC1</i>	57
3	Diskussion.....	60
3.1	Die PREs sind für die <i>TEC1</i> -Expression unter vegetativen Bedingungen wichtig und vermitteln die Pheromon-abhängige Induktion der <i>TEC1</i> -Expression.....	60
3.2	Die Expression von <i>TEC1</i> wird durch Nährstoffe reguliert	63
3.3	Der 3'-UTR von <i>TEC1</i> wird vermutlich für die Regulation durch Mpt5 benötigt.....	66
3.4	Regulation der Tec1-Proteinstabilität durch Nährstoffe.....	67
3.5	Die Ste12-gesteuerte Expression von <i>TEC1</i> kann durch ein einzelnes, synthetisches <i>cis</i> -Element gezielt ersetzt werden	69
3.6	Die beiden Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 sind auf mehreren Ebenen komplex miteinander verschaltet.....	70
4	Material.....	74
4.1	Chemikalien.....	74
4.2	Enzyme, Größenstandards, Kits und Sonstiges	74
4.3	Auftragsarbeiten	75
4.4	Puffer und Lösungen	75
4.5	Nährmedien	80
4.6	Antibiotika.....	82
4.7	Verwendete Antikörper	82
4.8	Verwendete Stämme und Plasmide	83
4.8.1	<i>E. coli</i> -Stämme	83
4.8.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	84
4.8.3	Plasmide	91
4.9	Verwendete Oligonukleotide.....	96
4.10	Geräte	98
4.11	Bezugsquellen.....	100

5	Methoden.....	101
5.1	Kultivierung von Mikroorganismen.....	101
5.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	101
5.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	101
5.2	Präparation von DNA.....	103
5.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	103
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels „Plasmid Mini-Kit“.....	103
5.2.3	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	103
5.3	Manipulation von DNA.....	104
5.3.1	Polymerase-Kettenreaktion: PCR.....	104
5.3.2	Sequenzspezifische Mutagenese.....	105
5.3.3	Restriktion von DNA.....	105
5.3.4	Gelelektrophorese von DNA und RNA in Agarosegelen.....	106
5.3.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	106
5.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	107
5.3.7	Integration von DNA-Kassetten in das Genom von <i>S. cerevisiae</i> zur Erzeugung von Gendeletionen.....	107
5.3.8	Fällung von DNA mit Ethanol.....	108
5.4	Transformationsmethoden.....	108
5.4.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	108
5.4.2	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	108
5.4.3	Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	109
5.5	Analyse von DNA.....	110
5.5.1	Sequenzierung.....	110
5.5.2	Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für die Southern Analyse.....	110
5.5.3	Nachweis von DNA: Southern-Analyse.....	110
5.6	Analyse von RNA.....	112
5.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	112
5.6.2	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden für die Northern-Analyse.....	113
5.6.3	Nachweis von RNA: Northern-Analyse.....	113
5.6.4	Restriktionsenzymatische Spaltung mit DNaseI.....	115
5.6.5	cDNA Synthese.....	116
5.6.6	Quantitative Real-Time PCR mit „iQ™ SYBR® Green Supermix“.....	116
5.7	Analyse von Proteinen.....	118
5.7.1	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für die immunochemische Detektion.....	118
5.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	118

5.7.3	Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	119
5.7.4	Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen	120
5.8	Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Proteinen	121
5.8.1	Expression von <i>MBP-TEC1-FLAG</i> und <i>MBP-STE12-FLAG</i>	121
5.8.2	Affinitätschromatographie von MBP-Tec1-FLAG und MBP-Ste12-FLAG	121
5.9	<i>In vitro</i> Interaktionstest von Proteinen mit DNA: Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	122
5.9.1	Herstellung Cyanin 5.5-markierter DNA-Fragmente	122
5.9.2	Gelretardierungsexperiment (EMSA).....	122
5.10	Untersuchung von <i>S. cerevisiae</i>	123
5.10.1	Fluoreszenzmikroskopie	123
5.10.2	Quantifizierung der Mikroskopie-Bilder	124
5.10.3	Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar	125
5.10.4	Herstellung diploider <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	125
5.10.5	Paarungstest	126
5.10.6	Test auf Pseudohyphenbildung.....	126
5.10.7	Halo-Assay	127
5.11	Bioinformatische Promotoranalyse	127
6	Literaturverzeichnis	128
7	Abbildungsverzeichnis.....	155
	Danksagung	157
	Erklärung	158
	Lebenslauf	159

1 Einleitung

1.1 Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus in der Molekularbiologie

Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um einen Hemiascomyceten, der taxonomisch der Ordnung der *Saccharomycetales* zugeordnet wird. Ihre Fähigkeit auch unter aeroben Bedingungen Zucker zu Alkohol zu vergären wird bereits seit über 6000 Jahren durch den Menschen für die Herstellung von Brot und alkoholischen Getränken wie Bier oder Wein genutzt (Fiechter et al., 1981; Cavalieri et al., 2003; McGovern et al., 2004). Natürliche Habitate von *S. cerevisiae* sind die Oberfläche kultivierter Pflanzen, wie beispielsweise reife Früchte und die Rinde von Eichen (Mrak and Phaff, 1948; Naumov et al., 1998). Die Verbreitung von *S. cerevisiae*-Zellen erfolgt vermutlich durch die Interaktion mit Insekten, wie etwa Wespen (Stefanini et al., 2012).

Aufgrund der kurzen Generationszeit, sowie der einfachen und kostengünstigen Kultivierung hat sich *S. cerevisiae* als Modellorganismus für eukaryotische Zellen etabliert und wird für die Untersuchung grundlegender Prozesse, wie den Zellzyklus, die DNA-Replikation, die Rekombination und den Metabolismus genutzt. *S. cerevisiae* war zudem der erste eukaryotische Organismus, dessen komplettes Genom sequenziert und veröffentlicht wurde (Goffeau et al., 1996). Große Bekanntheit in der breiten Öffentlichkeit erlangte die Bäckerhefe im Jahr 2014 als es erstmals gelang, ein synthetisches Chromosom in einer eukaryotischen Zelle zu assemblieren (Annaluru et al., 2014). In der Industrie findet *S. cerevisiae* neben der Lebensmittelproduktion auch Verwendung in der Herstellung von Medikamenten, wie zum Beispiel Insulin oder biologischer Treibstoffe (Tøttrup and Carlsen, 1990; Petrovič, 2015).

S. cerevisiae-Zellen können sowohl in haploider, als auch in diploider Form vorliegen, sind in der Natur aber meist in der diploiden Form zu finden. In Abhängigkeit von Nährstoffen können sie sich in verschiedene Zelltypen differenzieren (Abb. 1). Bei einem guten Nährstoffangebot liegen haploide und diploide *S. cerevisiae*-Zellen in der einzelligen Hefeform vor und proliferieren mittels Sprossung. In diesem Prozess generiert die sogenannte Mutterzelle mittels mitotischer Zellteilung eine Tochterzelle, welche sich durch Cytokinese von der Mutterzelle löst (Hartwell, 1974). An dieser Stelle bildet sich eine Chitin-haltige Narbe, welche als Knospungs- (Mutterzelle) beziehungsweise Geburtsnarbe (Tochterzelle) bezeichnet wird (Barton, 1950; Bacon et al., 1966). Haploide Zellen weisen ein axiales Sprossungsmuster auf und bilden weitere Tochterzellen nahe der Geburtsnarbe, während diploide Zellen ein bipolares Sprossungsmuster zeigen (Freifelder, 1960; Streiblová, 1970; Hicks et al., 1977).

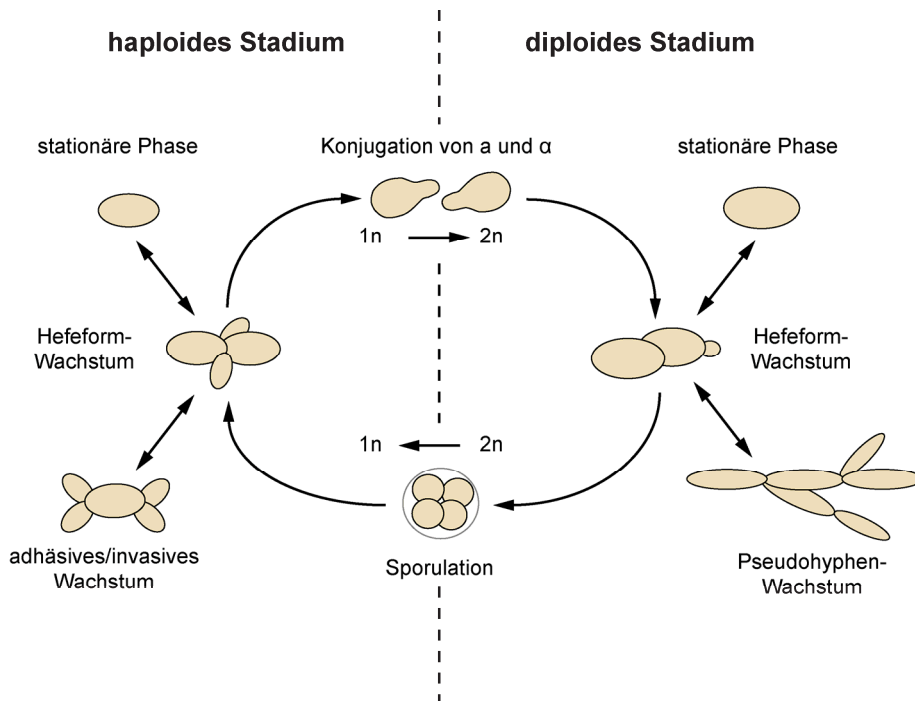


Abb. 1: Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae kann sowohl in der haploiden, als auch der diploiden Form vorliegen und vermehrt sich in der Hefeform vegetativ. Der Wechsel von der haploiden zur diploiden Form erfolgt durch die Fusion zweier haploider Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps bei der Konjugation. Der Wechsel von der diploiden zur haploiden Form erfolgt unter Nährstoffmangelbedingungen durch Sporulation, bei der ein Ascus mit vier Sporen gebildet wird. *S. cerevisiae* ist zudem in der Lage entsprechend der verfügbaren Nährstoffe verschiedene Differenzierungsprogramme auszuführen. Der Mangel an fermentierbaren Kohlenstoffquellen löst den Eintritt in die stationäre Phase aus, wohingegen Stickstoffmangel und Glukosemangel jeweils in diploiden und haploiden Zellen die Ausbildung von Pseudohyphen und das adhäsive/invasive Wachstum auslösen.

Haploide Hefezellen können in zwei verschiedenen Geschlechtstypen vorliegen, *MATa* und *MATα*. Durch die Zellfusion und Karyogamie zweier haploider Zellen unterschiedlichen Geschlechts entsteht eine diploide *MATa/MATα*-Zelle (vergleiche Kapitel 1.2.1). Wildisolate sind zudem in der Lage ihren Geschlechtstyp in haploiden Zellen zu wechseln, indem sie ihren aktiven Geschlechtstyp-Lokus gegen den inaktiven austauschen. Daraus resultiert eine heterogene Population mit haploiden *MATa*- und *MATα*-Zellen, welche wiederum durch Konjugation diploide *MATa/MATα*-Zellen bilden können. Solche Stämme werden als homothallisch bezeichnet und benötigen für den Geschlechtstypwechsel die HO-Endonuklease. Aufgrund einer Mutation im *HO*-Gen sind Laborstämme nicht zum Wechsel ihres Geschlechtstyps befähigt und werden deshalb als heterothallisch bezeichnet.

Ist keine fermentierbare Kohlenstoffquelle verfügbar, arretieren sowohl haploide, als auch diploide *S. cerevisiae*-Zellen ihren Zellzyklus in G1 und gehen in die stationäre Phase über, wo sie während des Nährstoffmangels verbleiben (Hartwell, 1974). Die Anwesenheit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle, wie Acetat, und ein gleichzeitiger Stickstoffmangel initiieren in diploiden Hefezellen den Eintritt in die Meiose und die darauf folgende Sporulation (Esposito and Klapholtz, 1981). Hierbei wird ein Ascus gebildet, welcher vier sehr

widerstandsfähige Sporen enthält. Diese können unter verbesserten Umweltbedingungen wieder zu haploiden Zellen auskeimen.

Bei einem Stickstoffmangel in Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wechseln diploide *S. cerevisiae*-Zellen von der einzelligen Hefeform zum mehrzelligen, filamentösen Pseudohyphenwachstum. Bei dieser Wachstumsform wird eine Kette aus verlängerten Zellen gebildet, welche unipolar am distalen Pol sprossen (Gimeno et al., 1992; Kron et al., 1994). Die neu entstehenden Tochterzellen lösen sich anschließend nicht vollständig von der Mutterzelle. Pseudohyphen sind imstande an Substrate zu haften und diese invasiv zu bewachsen, um sich so mögliche neue Nährstoffquellen zu erschließen (Gimeno et al., 1992). Unter bestimmten Bedingungen, wie etwa Glukosemangel, kann in haploiden *S. cerevisiae*-Zellen ein ähnliches Phänomen beobachtet werden, welches als haploid adhäsives oder invasives Wachstum bezeichnet wird (Cullen and Sprague, 2000). Hierbei entsteht ebenfalls eine Kette aus Zellen, jedoch sind diese Zellen nur leicht verlängert und sprossen bipolar. Das Pseudohyphenwachstum und das adhäsive Wachstum kann auch durch sezernierte Alkohole, wie 3-Methyl-1-butanol und 1-Butanol, Aminosäuremangel oder Sauerstoffmangel ausgelöst werden (Ljungdahl et al., 1992; Dickinson, 1994; Kuriyama and Slaughter, 1995; Dickinson, 1996; Lorenz et al., 2000a).

1.2 Die zellulären Differenzierungsprogramme Konjugation und Adhäsion

1.2.1 Die Konjugation

Bei der Konjugation erkennen sich zwei haploide Zellen, indem sie Geschlechtstyp-spezifische Pheromone produzieren. *MATa*-Zellen sezernieren α -Faktor, welcher durch *MAT α* -Zellen über den spezifischen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor Ste3 erkannt wird (Wilkinson and Pringle, 1974; Hagen et al., 1986). Im Gegenzug wird der sogenannte α -Faktor durch *MAT α* -Zellen sezerniert und ebenfalls über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor durch *MATa*-Zellen erkannt (Duntze et al., 1970; Kurjan and Herskowitz, 1982). In *MATa*-Zellen wird dieser Rezeptor jedoch durch das Gen *STE2* codiert (Jenness et al., 1983; Blumer et al., 1988). Als Reaktion auf das Pheromon kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest in G1, sowie gerichtetem Wachstum zum Konjugationspartner (Levi, 1956; Bücking-Throm et al., 1973). Um dieses gerichtete Wachstum zum Konjugationspartner zu ermöglichen, wird das Aktincytoskeletts umorganisiert und die daraus resultierende Zellmorphologie als „Shmoo“ bezeichnet (Mackay and Manney, 1974; Hasek et al., 1987). In einem nächsten Schritt nehmen die beiden Zellen über Zellwandproteine, sogenannte Agglutinine, Kontakt auf und fusionieren miteinander. Dabei erfolgt zunächst die Fusion der Cytoplasmen (Plasmogamie) und anschließend die der

Kerne (Karyogamie). Die Koordination dieser Prozesse erfolgt durch das hochkonservierte Fus3/Kss1-MAPK Modul, welches zudem auch an der Regulation des adhäsiven Wachstums und der Pseudohyphenbildung beteiligt ist (Bardwell, 2004; Chen and Thorner, 2007).

1.2.2 Die Adhäsion

Die Zell-Zell-Adhäsion, sowie die Adhäsion an biotische und abiotische Oberflächen, sind von großer wirtschaftlicher und medizinischer Bedeutung. In der Nahrungsmittelindustrie spielt die Adhäsion von Pilzen eine wichtige Rolle, da sie Biofilme in Industrieanlagen bilden können, welche zu Verunreinigungen der Produkte führen (Kumar and Anand, 1998; Verstrepen and Klis, 2006). Bei einem Biofilm handelt es sich um einen Zellverbund aus Mikroorganismen, welche an Oberflächen und sich selbst haften (Monds and O'Toole, 2009; Brückner and Mösch, 2012).

Einen sehr großen Stellenwert in der Lebensmittelproduktion hat die Fähigkeit der Zell-Zell-Adhäsion bei der Herstellung alkoholischer Getränke wie Bier oder Wein. Sie wird dafür genutzt, die Hefezellen am Ende des Gärungsprozesses kostengünstig und einfach zu entfernen (Bauer et al., 2010; Soares, 2011; Brückner and Mösch, 2012).

Die Biofilmbildung humanpathogener Pilze, wie beispielsweise *Candida albicans* und *Candida glabrata* auf medizinischer Ausrüstung, wie Prothesen oder Kathetern, stellt hingegen eine ernstzunehmende Bedrohung für immunsupprimierte Patienten dar (Douglas, 2003; Kojic and Darouiche, 2004). Durch die Anhaftung an medizinische Ausrüstung aus Plastik gelangen die Pilze in Blutgefäße und Gewebe. Dabei dient die Ausbildung eines gegenüber Antimykotika hochresistenten Biofilms dem Schutz der *Candida*-Zellen (Douglas, 2003; Kojic and Darouiche, 2004). Die Ausbildung von Filamenten ist hierbei entscheidend für die Virulenz sowohl human- als auch Pflanzen-pathogener Pilze, da sie das Eindringen in das Wirtsgewebe ermöglichen (Lo et al., 1997). So erlaubt beispielsweise die Ausbildung von dikaryotischen Hyphen dem Pflanzen-pathogenen Pilz *Ustilago maydis* den Befall von Maispflanzen (Bölker, 2001).

Die Anhaftung der Zellen aneinander, oder an biotische und abiotische Oberflächen wird durch spezialisierte Zelloberflächenproteine, sogenannte Adhäsine, vermittelt. In *S. cerevisiae* wird in dem Laborstamm $\Sigma 1278b$ jedoch lediglich *FLO11* exprimiert, da die anderen Adhäsine epigenetisch stillgelegt sind (Halme et al., 2004). Die Expression des Adhäsins *FLO11* unterliegt einer komplexen Regulation durch viele verschiedene Signalwege, was sich auch in der außergewöhnlichen Größe seines Promotors mit über 3 kb widerspiegelt (Abb. 2) (Rupp et al., 1999).

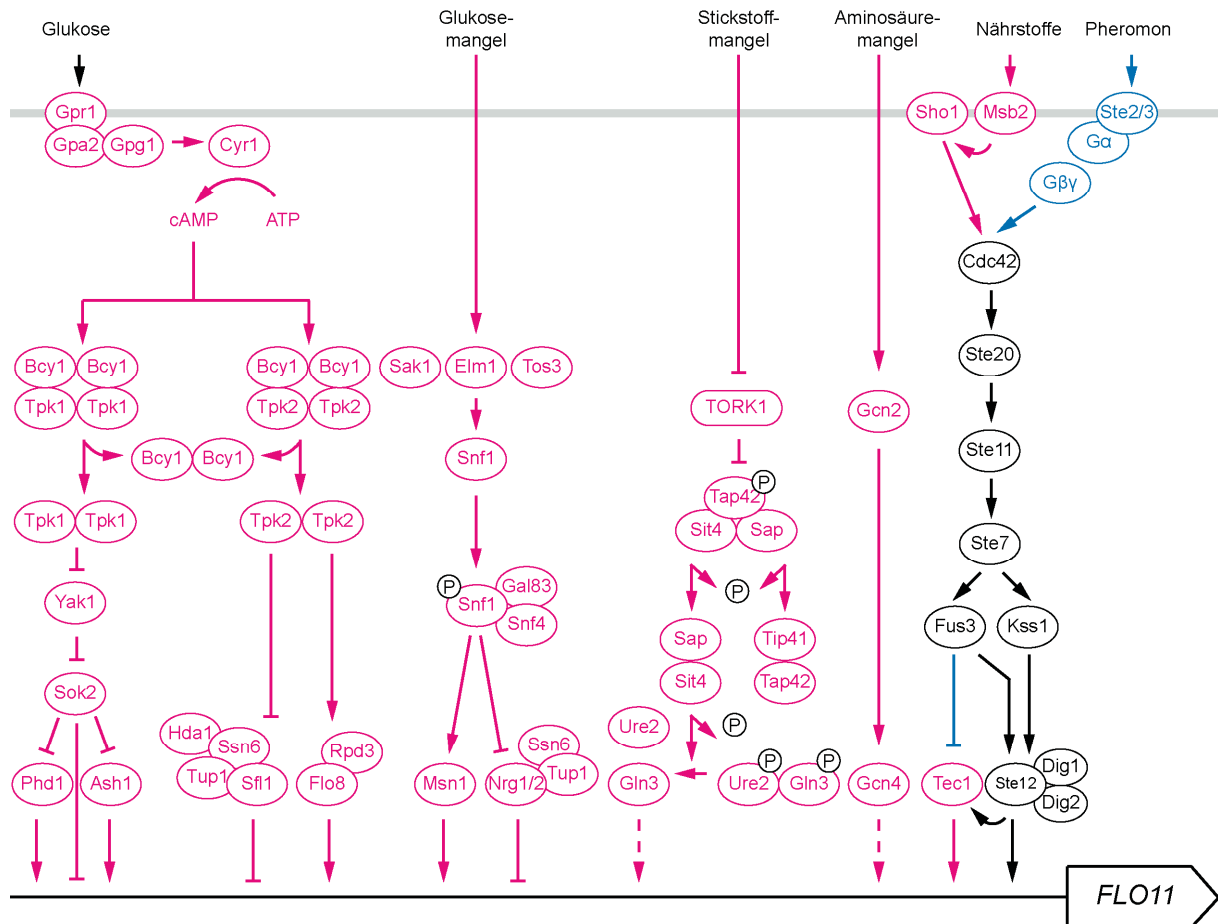


Abb. 2: Signalwege zur Kontrolle der *FLO11*-Expression.

Gezeigt sind die verschiedenen Signalwege mit den wichtigsten Komponenten, welche die Expression von *FLO11* in Abhängigkeit verschiedener Signale steuern (von links nach rechts): der cAMP/PKA-Signalweg, der Snf1/Glukose-Repressionsweg, der TOR-Signalweg, die generelle Aminosäurekontrolle und das Fus3/Kss1-MAPK Modul (für Details siehe Text). Komponenten, die bei der Regulation von *FLO11* nur für das adhäsive Wachstum benötigt werden, sind in Rot dargestellt. Komponenten, die nur für die Konjugation benötigt werden, sind in Blau dargestellt und Komponenten, die für beide Differenzierungsprogramme benötigt werden, in schwarz.

Auf transkriptioneller Ebene wird *FLO11* unter anderem durch das Fus3/Kss1-MAPK Modul, den cAMP/PKA-Signalweg, den Snf1/Glukose-Repressionsweg, den TOR-Signalweg und die generelle Aminosäurekontrolle reguliert, welche in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden (Gimeno et al., 1992; Ljungdahl et al., 1992; Gavrias et al., 1996; Mösch and Fink, 1997; Lo and Dranginis, 1998; Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 1999; Rupp et al., 1999; Cutler et al., 2001; Kuchin et al., 2002; Palecek et al., 2002; Braus et al., 2003; Van De Velde and Thevelein, 2008; Vinod et al., 2008; Brückner and Mösch, 2012).

1.2.2.1 Das Fus3/Kss1-MAPK Modul

Das in Eukaryoten hochkonservierte Fus3/Kss1-MAPK (mitogen aktivierbare Proteinkinase) Modul steuert in haploiden *S. cerevisiae*-Zellen signalabhängig die beiden zellulären Differenzierungsprogramme Konjugation und adhäsives Wachstum (Bardwell, 2004; Chen and Thorner, 2007). Zudem ist es ebenfalls an der Kontrolle der Pseudohyphenbildung in diploiden

Hefestämmen und der Osmoregulation durch den HOG-Signalweg beteiligt. Das Fus3/Kss1-MAPK Modul besteht sowohl aus Komponenten, welche für die beiden Differenzierungsprogramme Konjugation und Adhäsion benötigt werden, als auch aus Komponenten, welche spezifisch für das jeweilige Differenzierungsprogramm sind (Abb. 2). Zu den gemeinsam genutzten Komponenten gehören die Rho-ähnliche GTPase Cdc42, das Gerüstprotein Ste50, die p21-aktiverbare Proteinkinase (PAK) Ste20, die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7, die MAPKs Fus3 und Kss1, sowie der Transkriptionsfaktor Ste12 und die beiden Repressoren Dig1 und Dig2 (Errede and Ammerer, 1989; Liu et al., 1993; Roberts and Fink, 1994; Ma et al., 1995; Simon et al., 1995; Zhao et al., 1995; Cook et al., 1996; Mösch et al., 1996; Cook et al., 1997; Madhani et al., 1997; Tedford et al., 1997; Ramezani Rad et al., 1998). Fus3 und Kss1 haben teilweise redundante Funktionen, allerdings wird die MAPK Fus3 hauptsächlich für die Konjugation und die MAPK Kss1 hauptsächlich für das adhäsive Wachstum benötigt. Die beiden Pheromonrezeptoren Ste2 und Ste3, das heterotrimere G-Protein, sowie das Gerüstprotein Ste5 sind Konjugations-spezifische Komponenten (Liu et al., 1993; Roberts and Fink, 1994). Der Transkriptionsfaktor Tec1 wird nur für die Adhäsion benötigt und das Signalmucin Msb2 und der Osmosensor Sho1 sind Komponenten des HOG-Signalwegs, welche ebenfalls eine Rolle bei der Adhäsion spielen (Gavrias et al., 1996; Mösch and Fink, 1997; Lo and Dranginis, 1998; Cullen et al., 2004; Vadaie et al., 2008).

Bei der Konjugation führt die Bindung eines Pheromonmoleküls an seinen spezifischen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Ste2 oder Ste3) auf der Zelloberfläche des Konjugationspartners zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins. Es kommt zum Austausch des an Gpa1 ($G\alpha$) gebundenen GDP durch GTP und der anschließenden Freigabe des Ste4/Ste18-Heterodimers ($G\beta\gamma$ -Komplex) (Whiteway et al., 1989; Blumer and Thorner, 1991; Klein et al., 2000; Dohlman, 2002; Bardwell, 2004). Der Ste4/Ste18-Komplex rekrutiert und aktiviert die Proteinkinase Ste20, den Ste5/Ste11-Komplex, sowie den Far1/Cdc24-Komplex (Whiteway et al., 1995; Zhao et al., 1995; Butty et al., 1998; Leeuw et al., 1998; Pryciak and Huntress, 1998; Nern and Arkowitz, 1999). Dabei vermittelt Ste18 die Bindung des Ste4/Ste18-Komplexes an die Cytoplasmamembran und Ste4 die Bindung der Effektorproteine (Whiteway and Thomas, 1994; Hirschman et al., 1997; Hirschman and Jenness, 1999; Manahan et al., 2000; Bardwell, 2004; Chen and Thorner, 2007). Der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor („guanine nucleotide exchange factor“, GEF) Cdc24 aktiviert daraufhin die Rho-ähnliche GTPase Cdc42 durch den Austausch von GDP zu GTP. Aktiviertes Cdc42 kann nun Ste20 an die Plasmamembran rekrutieren und binden. Durch die Bindung von Cdc42 an die CRIB-Domäne („Cdc42/Rac1-interactive binding“) von Ste20 wird die Autoinhibierung der Kinaseaktivität durch die CRIB-

Domäne von Ste20 aufgehoben (Lamson et al., 2002; Ash et al., 2003). Durch die Interaktion des Gerüstproteins Ste5 mit der G β -Untereinheit Ste4 wird das Gerüstprotein Ste5 und die daran gebundene MAPKKK Ste11 in räumliche Nähe zu Ste20 gebracht und ermöglicht so die Phosphorylierung von Ste11 (Whiteway et al., 1995; Feng et al., 1998; Pryciak and Huntress, 1998). Die Phosphorylierung von Ste11 durch Ste20 wird ebenfalls durch das Gerüstprotein Ste50 gefördert, welches mit Cdc42 und Ste11 interagiert (Ramezani Rad et al., 1998; Wu et al., 1999). Ste11 phosphoryliert dann die MAPKK Ste7, deren Substrate die beiden MAPKs Fus3 und Kss1 sind (Gartner et al., 1992; Errede et al., 1993; Zhou et al., 1993; Neiman and Herskowitz, 1994; Zheng and Guan, 1994; Ma et al., 1995). Zu ihren Zielgenen gehören die Transkriptionsfaktoren Ste12, Tec1, Dig1 und Dig2. Ste12, Dig1 und Dig2 liegen unter vegetativen Bedingungen in einem inaktiven Komplex vor (vergleiche Kapitel 1.3 und 1.5). Bei einem Pheromonsignal werden sie durch Fus3 und Kss1 phosphoryliert, was zur Freisetzung von Ste12 aus dem Komplex mit den Repressoren Dig1 und Dig2 führt (Elion et al., 1993; Cook et al., 1996; Tedford et al., 1997; Bardwell et al., 1998b; Olson et al., 2000). Aktiviertes Ste12 kann dann seine Zielgene aktivieren, zu denen *FUS1*, *FIG2* und *TEC1* gehören (Oehlen and Cross, 1998; White and Rose, 2001). Das Membranprotein Fus1 wird während der Konjugation für die Zellfusion benötigt (McCaffrey et al., 1987; Trueheart et al., 1987). Im Gegensatz zu Ste12, Dig1 und Dig2 wird Tec1 nur für das adhäsive Wachstum benötigt. Aus diesem Grund wird es als Reaktion auf ein Pheromonsignal durch Fus3 hauptsächlich an T273 phosphoryliert und so zum Ubiquitin-vermittelten Abbau markiert (Bao et al., 2004; Brückner et al., 2004; Chou et al., 2004). Dieser Mechanismus soll eine Aktivierung Adhäsions-spezifischer Gene während der Konjugation verhindern. Allerdings ist bislang nicht geklärt, weshalb die *TEC1*-Transkription durch Pheromon induziert wird. Auch der Zellzyklusinhibitor Far1 wird durch Fus3 phosphoryliert und bindet im Zellkern an den Cdc28/Cln-Komplex, um ihn zu deaktivieren (Chang and Herskowitz, 1990; Peter and Herskowitz, 1994). Dies hat einen Arrest des Zellzyklus in G1 zur Folge. Zu diesem Zeitpunkt liegt ein haploides Genom in jeder Zelle vor, was für die Ausbildung diploider Zellen notwendig ist (Chen and Thorner, 2007).

Wie bereits zuvor beschrieben, werden manche der Komponenten des Fus3/Kss1-MAPK Moduls auch für das adhäsive Wachstum genutzt. Die Aktivierung erfolgt hier durch das GTP-bindende Protein Ras2, oder das Mucin Msb2 (Mösch et al., 1996; Cullen et al., 2004). Welches Signal durch Ras2 weiter geleitet wird und wie Ras2 Cdc42 aktiviert, ist nicht bekannt (Mösch et al., 1996). Das Mucin Msb2 besteht aus einer großen, extrazellulären, inhibitorischen Domäne, einer die Membran durchspannenden Domäne und einer kurzen intrazellulären Domäne. Es interagiert mit dem Osmosensor Sho1 und fungiert vermutlich als Sensor für

Nährstoffe (Cullen et al., 2004). Einem aktuellen Modell zufolge führt ein Nährstoffmangel zur Expression der Protease Yps1, welche Msb2 prozessiert. Daraufhin wird die extrazelluläre Domäne freigegeben und sekretiert, was vermutlich zur Aktivierung von Msb2 führt (Vadaie et al., 2008). Aktives Msb2 interagiert dann, wahrscheinlich über die intrazelluläre Domäne, mit Sho1 und es wird davon ausgegangen, dass die beiden Proteine anschließend die MAPK-Signalkaskade über Cdc42 und Ste20 aktivieren (Cullen et al., 2004; Vadaie et al., 2008). Dies geschieht vermutlich über Bem4, welches mit Sho1 interagiert (Pitoniak et al., 2015). Es wird davon ausgegangen, dass Bem4 mit Cdc24 interagiert und so die Aktivierung von Cdc42 durch Cdc24 fördert. Zudem interagiert es mit Ste11 und fördert so die Lokalisierung von Ste11 an der Plasmamembran (Pitoniak et al., 2015). Das Membranprotein Opy2 wird für die Rekrutierung des Gerüstproteins Ste50 an die Plasmamembran benötigt, wo es die Phosphorylierung von Ste11 durch Ste20 fördert. Dafür interagiert es mit Cdc42 und Ste11 und bringt Ste11 so in räumliche Nähe zu Ste20 (Ramezani Rad et al., 1998; Wu et al., 1999; Karunanithi and Cullen, 2012). Anschließend wird das Signal durch die sequenzielle Phosphorylierung von Ste11, Ste7, Fus3 und Kss1 weiter geleitet. Wie zuvor erwähnt, wird Ste12 auch für das adhäsive Wachstum benötigt. Die Phosphorylierung von Ste12 durch Kss1 führt zur Freigabe aus dem inhibitorischen Komplex mit Dig1 und Dig2 (Elion et al., 1993; Cook et al., 1996; Tedford et al., 1997; Bardwell et al., 1998b). Ste12 kann dann die Expression des Adhäsions-spezifischen Transkriptionsfaktors *TEC1* aktivieren, welcher seine Transkription nun autoregulatorisch verstärken kann (Madhani and Fink, 1997; Oehlen and Cross, 1998). Gemeinsam können Tec1 und Ste12 in einem Komplex mit Dig1 Zielgene des adhäsiven Wachstums, wie beispielsweise das Adhäsin *FLO11*, regulieren (Chou et al., 2006). Dabei vermittelt hauptsächlich Tec1 die DNA-Bindung und Ste12 die Transkriptionsaktivierung. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass Tec1 auch Ste12-unabhängig die Genexpression regulieren kann und dabei mit den beiden Co-Aktivatoren Msa1 und Msa2 interagiert (vergleiche Kapitel 1.5) (Heise et al., 2010; van der Felden et al., 2014). Zusätzlich zur Nutzung einiger Komponenten des Fus3/Kss1-MAPK Moduls im HOG-Signalweg, greifen auch andere Signalwege, die an der Regulation des adhäsiven Wachstums beteiligt sind, in die Signalweiterleitung des Fus3/Kss1-MAPK Moduls ein. So konnte bereits gezeigt werden, dass der cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalweg die Signalweiterleitung unterhalb von Ste20 beeinflussen kann und die beiden Signalwege möglicherweise auf der Ebene der beiden Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 miteinander verknüpft sind (Mösch et al., 1999). Außerdem ist das GTP-bindende Protein Ras2 an der Aktivierung beider Signalwege beteiligt (Toda et al., 1985; Mösch et al., 1996, 1999). Der TOR-Signalweg

beeinflusst ebenfalls die Stabilität von Tec1 in Abhängigkeit der verfügbaren Nährstoffe (vergleiche Kapitel 1.4) (Brückner et al., 2011).

1.2.2.2 Der cAMP/PKA-Signalweg

Der cAMP/PKA-Signalweg spielt in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei der Nährstoff-abhängigen Kontrolle zellulärer Prozesse, wie dem Metabolismus, der Stressresistenz, der Sporulation und des adhäsiven Wachstums (Thevelein and De Winde, 1999; Gagiano et al., 2002). Die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs kann, je nach Nährstoffbedingung, auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Analog zum Fus3/Kss1-MAPK Modul kann eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs über Ras2 erfolgen (Toda et al., 1985; Mösch et al., 1999). Extrazelluläre Glukose stimuliert die Aktivierung von Ras2 durch den GEF Cdc25 über einen bislang unbekannten Mechanismus (Gagiano et al., 2002; Zaman et al., 2008; Brückner and Mösch, 2012; Conrad et al., 2014). Einem aktuellen Modell zufolge führt die Phosphorylierung von intrazellulärer Glukose zur Inhibierung der beiden GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) Ira1 und Ira2, welche Ras2 negativ regulieren (Tanaka et al., 1989, 1990; Colombo et al., 2004). Dadurch liegt mehr GTP-gebundenes, aktives Ras2 in der Zelle vor. Dies setzt einen Transport der extrazellulären Glukose in die Zelle voraus. Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs stellt ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptorsystem dar. Bei dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt es sich um das Transmembranprotein Gpr1, welches vermutlich die Verfügbarkeit extrazellulärer Glukose und Saccharose erkennt (Lorenz et al., 2000b; Rolland et al., 2000; Lemaire et al., 2004). Das mit Gpr1-assoziierte G-Protein setzt sich aus Gpa2 als $G\alpha$ -Untereinheit und Gpg1 als mutmaßliche $G\gamma$ -Untereinheit zusammen (Nakafuku et al., 1988; Kübler et al., 1997; Xue et al., 1998; Kraakman et al., 1999). Als $G\beta$ -Untereinheit kommen die beiden Kelch-Proteine Gpb1 und Gpb2 in Frage, oder Asc1, das strukturell zu anderen $G\beta$ -Untereinheiten verwandt ist (Harashima and Heitman, 2002; Batlle et al., 2003; Zeller et al., 2007). Neben Glukose kann der PKA-Signalweg auch durch Ammonium über die Ammoniumpermease Mep2, Aminosäuren über die Aminosäurepermease Gap1, sowie Phosphate über den anorganischen Phosphat-Transporter Pho84 beeinflusst werden (Lorenz and Heitman, 1997, 1998a, 1998b; Donaton et al., 2003; Giots et al., 2003; Van Nuland et al., 2006).

Diese hier genannten Möglichkeiten zur Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs führen zur Aktivierung der Membran-assoziierten Adenylatzyklase Cyr1. Sie katalysiert daraufhin die Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP aus ATP (Kataoka et al., 1985). Der Abbau von cAMP zu AMP erfolgt über die beiden Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2 (Suoranta and Londesborough, 1984; Sass et al., 1986; Nikawa et al., 1987). Die PKA besteht aus der

regulatorischen Untereinheit Bcy1 und der katalytischen Untereinheit Tpk1, Tpk2 oder Tpk3, welche jeweils als Dimer vorliegen (Toda et al., 1987a, 1987b). Durch die Komplexbildung von Bcy1 mit Tpk1, Tpk2 oder Tpk3 wird die PKA-Aktivität inhibiert. Die Bindung von cAMP an das Bcy1-Dimer führt zur Dissoziation der regulatorischen Untereinheit von der katalytischen Untereinheit und somit zur Aktivierung der PKA (Toda et al., 1987a, 1987b; Zaman et al., 2008; Conrad et al., 2014). Die katalytischen Untereinheiten der PKA üben trotz ihrer Ähnlichkeit verschiedene Aufgaben bei der Kontrolle des adhäsiven Wachstums aus. So fördert Tpk2 das adhäsive Wachstum, indem es zum einen den Repressor Sfl1 inhibiert und den Aktivator Flo8 aktiviert und so die Expression von *FLO11* ermöglicht (Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 1999; Rupp et al., 1999). Tpk1 und Tpk3 haben aufgrund einer negativen Rückkopplung einen negativen Einfluss auf das adhäsive Wachstum (Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 1999). Zusätzlich inaktiviert Tpk1 die DYRK-Kinase („dual-specificity tyrosine-regulated protein kinase“) Yak1 durch Phosphorylierung (Zhu et al., 2000; Budovskaya et al., 2005; Malcher et al., 2011). Aktives, unphosphoryliertes Yak1 inhibiert den Repressor Sok2 über einen bislang unbekannten Mechanismus (Malcher et al., 2011). Wird Yak1 inaktiviert, kann Sok2 die Expression von *FLO11* sowohl direkt durch Bindung an den *FLO11*-Promotor, als auch indirekt durch Inhibierung der beiden Aktivatoren Phd1 und Ash1 negativ beeinflussen (Gimeno and Fink, 1994; Ward et al., 1995; Pan and Heitman, 2000). Bislang ist nicht geklärt, wie genau der cAMP/PKA-Signalweg das filamentöse Wachstum stimuliert. Das filamentöse Wachstum wird unter anderem durch Glukosemangel induziert und für die Kontrolle durch den cAMP/PKA-Signalweg ist eine hohe Aktivität der PKA notwendig. Diese wird jedoch durch eine hohe Glukosemenge erreicht.

Wie bereits zuvor beschrieben, kontrolliert der cAMP/PKA-Signalweg möglicherweise Komponenten des Fus3/Kss1-MAPK Moduls (1.2.2.1) (Mösch et al., 1999).

1.2.2.3 Der Snf1/Glukose-Repressionsweg

Der Snf1/Glukose-Repressionsweg kontrolliert in *S. cerevisiae* hauptsächlich die Anpassung an Glukosemangel (Gancedo, 1998; Carlson, 1999). Er ist neben dem cAMP/PKA-Signalweg ebenfalls an der Kontrolle der *FLO11*-Expression in Abhängigkeit der verfügbaren Glukosemenge beteiligt (Kuchin et al., 2002). Ist ausreichend Glukose im Medium vorhanden, wird sie durch einen Hexose-Transporter aufgenommen und durch eine Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert (Verstrepen et al., 2004; Conrad et al., 2014). Dies führt zur Aktivierung eines Phosphatase-Komplexes bestehend aus der katalytischen Untereinheit Glc7 und der regulatorischen Untereinheit Reg1, welcher die Snf1-Kinase durch Dephosphorylierung inaktiviert (Tu and Carlson, 1995; Ludin et al., 1998). Der heterotrimere

Snf1-Komplex setzt sich aus der Snf1-Serin/Threonin-Kinase als katalytische α -Untereinheit, der regulatorischen γ -Untereinheit Snf4, sowie einer der drei β -Untereinheiten Gal83, Sip1 oder Sip2 zusammen (Celenza et al., 1989; Yang et al., 1994; Jiang and Carlson, 1997). Für die Kontrolle des adhäsiven Wachstums wird aber hauptsächlich Gal83 benötigt (Vyas et al., 2003). Ist die Snf1-Kinase inaktiv, binden die beiden transkriptionellen Repressoren Nrg1 und Nrg2 an die Promotoren ihrer Zielgene, wie beispielsweise *FLO11*, um diese zu reprimieren, indem sie weitere Repressoren wie Ssn6 und Tup1 rekrutieren (Park et al., 1999; Kuchin et al., 2002). Bei Glukosemangel wird die Snf1-Kinase durch eine der drei Kinasen Sak1, Elm1 und Tos3 phosphoryliert und aktiviert (McCartney and Schmidt, 2001; Hong et al., 2003; Nath et al., 2003; Sutherland et al., 2003). Zudem wird die Aktivierung von Snf1 durch die Interaktion mit der γ -Untereinheit Snf4 gefördert, da Snf4 die Autoinhibition von Snf1 unterdrückt (Jiang and Carlson, 1996; Crute et al., 1998; Leech et al., 2003). Der Snf1/Gal83-Komplex inaktiviert daraufhin Nrg1 und Nrg2 über einen bislang unbekannten Mechanismus und ermöglicht so die Expression von *FLO11* (Vyas et al., 2001; Kuchin et al., 2002).

Neben der Glukosekontrolle ist die Snf1-Kinase vermutlich auch an der Stickstoffkontrolle von *FLO11* und der Regulation der Translation des Transkriptionsfaktors Gcn4 beteiligt (vergleiche Kapitel 1.2.2.5) (Kuchin et al., 2002; Shirra et al., 2008).

1.2.2.4 Der TOR-Signalweg

Der in Eukaryoten hochkonservierte TOR-Signalweg steuert Nährstoff-abhängig das Wachstum und seine unkontrollierte Aktivierung steht im Zusammenhang mit Krebs (Kim and Guan, 2011; Loewith and Hall, 2011). Die zentrale Komponente des TOR-Signalwegs stellen der TOR-Komplex 1 (TORK1) und der TOR-Komplex 2 (TORK2) dar, von denen lediglich der TORK1 durch das makrozyklische Lakton Rapamycin inhibiert werden kann (Heitman et al., 1991; Loewith et al., 2002). Die Aktivität des TORK1 wird durch verschiedene Nährstoffsignale, wie etwa die Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- oder Aminosäureverfügbarkeit und Stressfaktoren, wie eine erhöhte Salzkonzentration, eine erhöhte Umgebungstemperatur oder Koffein beeinflusst (Urban et al., 2007; Loewith and Hall, 2011). Die Aktivität von TORK2 wird möglicherweise durch negative Umwelteinflüsse gesteuert (Loewith and Hall, 2011). Allerdings ist weitestgehend unverstanden, wie diese Signale erkannt und an TORK1 und TORK2 weiter gegeben werden.

Hauptkomponente dieser beiden Komplexe ist die Tor-Kinase („Target of Rapamycin“), welche zur Familie der Phosphatidylinositol-ähnlichen Kinasen gehört (Cafferkey et al., 1993; Keith and Schreiber, 1995). Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten besitzt *S. cerevisiae* zwei Tor-Kinasen: Tor1 und Tor2 (Heitman et al., 1991; Helliwell et al., 1994). Der TORK1 setzt

sich aus Tor1 oder Tor2, Kog1, Lst8 und Tco89 zusammen und kontrolliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Proteinbiosynthese, die Ribosomenbiogenese, den Zellzyklus, die Zellgröße, die Nährstoffaufnahme und die Autophagie (Loewith et al., 2002; Wedaman et al., 2003; Reinke et al., 2004; Loewith and Hall, 2011; Conrad et al., 2014). Zudem ist er an der Kontrolle des adhäsiven Wachstums durch Stickstoff beteiligt (Cutler et al., 2001; Vinod et al., 2008). Der TORC2 besteht aus Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit1 und Lst8 und kontrolliert die Organisation des Aktincytoskeletts, die Endocytose und die Sphingolipidbiosynthese (Loewith et al., 2002; Wedaman et al., 2003; Reinke et al., 2004; Loewith and Hall, 2011; Conrad et al., 2014).

Bislang ist nicht genau verstanden, wie der TORC1 die Expression von *FLO11* beeinflusst, es wird aber davon ausgegangen, dass die Regulation über die Stickstoff-Kataboliten-Repression erfolgt (Cutler et al., 2001). Diesem Modell zufolge ist der TORC1 unter guten Nährstoffbedingungen aktiv und phosphoryliert das essentielle Protein Tap42, welches daraufhin die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die PP2A-ähnliche Phosphatase Sit4 bindet und inhibiert (Di Como and Arndt, 1996; Jiang and Broach, 1999; Santhanam et al., 2004). Die PP2A-ähnliche Phosphatase besteht aus der katalytischen Untereinheit Sit4 und einer der regulatorischen Untereinheiten Sap155, Sap190 oder Sap185 (Arndt et al., 1989; Luke et al., 1996). Durch die Bindung von phosphoryliertem Tap42 an die katalytische Untereinheit Sit4 wird die Bindung der regulatorischen Untereinheit verhindert. Der Transkriptionsaktivator Gln3 liegt dadurch bedingt phosphoryliert vor und ist mit dem Regulator Ure2 assoziiert (Coschigano and Magasanik, 1991; Beck and Hall, 1999). Die Interaktion mit Ure2 dient dazu, Gln3 im Cytoplasma festzuhalten, wodurch eine Transkription von Zielgenen verhindert wird. Stickstoffmangel führt hingegen zu einer Inaktivierung des TORC1 und der Dephosphorylierung von Tap42, welches von Sit4 dissoziiert und mit Tip41 assoziiert (Di Como and Arndt, 1996; Jiang and Broach, 1999; Jacinto et al., 2001; Santhanam et al., 2004; Vinod et al., 2008). Die Assoziation von Tip41 mit Tap42 inhibiert Tap42 und verhindert so seine Bindung an Sit4 (Jacinto et al., 2001). Sit4 kann nun mit einer seiner regulatorischen Untereinheiten assoziieren und dephosphoryliert Ure2 und Gln3, welche dissoziieren (Beck and Hall, 1999). Freies Gln3 transloziert in den Zellkern und fördert die Aktivierung seiner Zielgene wie beispielsweise *FLO11* (Lorenz and Heitman, 1998b; Beck and Hall, 1999). Ob es die Expression von *FLO11* direkt oder indirekt kontrolliert, ist bislang nicht bekannt. In einer Studie konnte zudem gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Tec1 positiv durch den aktiven TORC1 über Tip41/Tap42/Sit4 reguliert wird (vergleiche Kapitel 1.4) (Brückner et al., 2011).

Der TOR-Signalweg ist ebenfalls mit anderen Signalwegen vernetzt und beeinflusst beispielweise die Lokalisation der katalytischen Untereinheit der PKA Tpk1 und der DYRK-Kinase Yak1 (Schmelzle et al., 2004). Auch die Aktivität des generellen Aminosäurekontrollwegs wird durch TOR1 beeinflusst (vergleiche Kapitel 1.2.2.5) (Valenzuela et al., 2001; Cherkasova and Hinnebusch, 2003; Kubota et al., 2003; Rohde et al., 2004; Matsuo et al., 2005).

1.2.2.5 Der generelle Aminosäurekontrollweg

Der generelle Aminosäurekontrollweg ist ebenfalls an der Regulation der Adhäsion und der *FLO11*-Expression beteiligt (Braus et al., 2003). Neben Aminosäuremangel wird er auch durch Kohlenstoff- und Stickstoffmangel, sowie diverse Stressfaktoren, wie beispielweise Hitze oder eine hohe Salzkonzentration aktiviert (Niederberger et al., 1981; Hinnebusch, 1988; Yang et al., 2000; Goossens et al., 2001; Valenzuela et al., 2001; Conrad et al., 2014). Die wichtigsten Komponenten dieses Signalwegs sind die Sensorkinase Gcn2 und der Transkriptionsfaktor Gcn4. Unter guten Nährstoffbedingungen liegt Gcn2 inaktiv vor und der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2) hat GTP gebunden und ist aktiv. Er bildet einen Komplex mit der geladenen Methionyl-tRNA und rekrutiert dann die kleine ribosomale Untereinheit (40 S), sowie weitere Translationsinitiationsfaktoren, um den Präinitiationskomplex zu bilden. Dieser bindet an das 5' Ende der mRNA und sucht dann nach dem Startcodon AUG. Wurde das Startcodon erkannt, wird das GTP zu GDP hydrolysiert, was zur Freigabe von eIF2 führt. Daraufhin wird die große ribosomale Untereinheit (60 S) rekrutiert und die Translation initiiert (Hinnebusch, 2005; Zaman et al., 2008; Conrad et al., 2014). Ein Mangel an Aminosäuren führt zu einer erhöhten Menge an ungeladenen tRNAs, welche an Gcn2 binden und es so aktivieren (Wek et al., 1989; Dong et al., 2000; Qiu et al., 2001). Aktiviertes Gcn2 phosphoryliert die α -Untereinheit des eIF2, was seinen GEF eIF2B inhibiert, sodass eIF2 in seiner GDP gebundenen Form vorliegt (Dever et al., 1992; Hinnebusch, 2005). Somit ist die Bildung des Präinitiationskomplexes und folglich auch die Translationseffizienz beeinträchtigt. Allerdings wird dadurch die Translation der *GCN4*-mRNA stimuliert (Hinnebusch, 2005). Der Transkriptionsfaktor Gcn4 kann dann seine Zielgene durch Bindung an spezifische Elemente in deren Promotoren aktivieren (Hope and Struhl, 1985; Oliphant et al., 1989). Allerdings scheint Gcn4 die Expression von *FLO11* nicht durch die Bindung seines Promotors zu beeinflussen, da sich keine Gcn4 Bindestelle im *FLO11*-Promotor befindet (Braus et al., 2003). Der generelle Aminosäurekontrollweg ist mit dem TOR-Signalweg und dem Snf1/Glukose-Repressionsweg verknüpft. Unter guten Nährstoffbedingungen kann der TOR1 die Sensorkinase Gcn2 indirekt durch Phosphorylierung mittels einer bislang unbekannten Kinase

inhibieren und Tap42 und Sit4 sind an der Regulation von Gcn2 beteiligt (Cherkasova and Hinnebusch, 2003). Snf1 kann Gcn4 unter Glukosemangel vermutlich auf Ebene der Translation inhibieren, indem es möglicherweise die Phosphorylierung von Gcn2 direkt oder indirekt fördert (Shirra et al., 2008). Unter Histidinmangel konnte eine Aktivierung von Snf1, sowie eine Phosphorylierung und daraus resultierende Aktivierung von Gcn2, nachgewiesen werden (Cherkasova et al., 2010). Somit fördert Snf1 unter diesen Bedingungen die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2.

1.3 Die Funktion und Struktur des Transkriptionsfaktors Ste12

Der Transkriptionsfaktor Ste12 zählt zur Familie der Ste12-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, welche sich nur im Reich der Pilze finden und an der Regulation der Differenzierung und Pathogenität in Abhängigkeit von Umweltreizen beteiligt sind (Hoi and Dumas, 2010). Das erste Ste12-Protein wurde in *S. cerevisiae* identifiziert und wird sowohl für die Kontrolle von Zielgenen der Konjugation, als auch für die Kontrolle von Zielgenen des adhäsiven und filamentösen Wachstums benötigt (Fields and Herskowitz, 1985; Errede and Ammerer, 1989; Gavrias et al., 1996; Madhani and Fink, 1997). Das Ste12-Ortholog Cph1 aus *C. albicans* wird ebenfalls für die Regulation der Konjugation und der Filamentbildung benötigt und kann in einem *S. cerevisiae*-Stamm die Funktionen von Ste12 bei der Konjugation und Pseudohyphenbildung übernehmen (Liu et al., 1994; Singh et al., 1994; Magee et al., 2002). Um die Transkription seiner Zielgene bei der Konjugation aktivieren zu können, bindet Ste12 an PREs („pheromone response elements“) mit der Konsensussequenz TGAAACA (Van Arsdell et al., 1987; Kronstad et al., 1987; Dolan et al., 1989; Yuan and Fields, 1991). Über die Interaktion von Ste12- und Ste12-ähnlichen Proteinen aus anderen Pilzen mit ihren *cis*-wirkenden Elementen ist bislang wenig bekannt (Hoi and Dumas, 2010). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Ste12-ähnliche Transkriptionsfaktor Clste12 aus dem Pflanzenpathogen *Colletotrichum lindemuthianum* an eine PRE-Sequenz binden kann (Hoi et al., 2007; Hoi and Dumas, 2010). Für die Kontrolle Adhäsions-spezifischer Zielgene kooperiert Ste12 mit dem Transkriptionsfaktor Tec1 (vergleiche Kapitel 1.4 und 1.5).

Neben der Phosphorylierung durch Fus3 und Kss1 zur Aktivierung von Ste12, erfolgt die Regulation der Ste12-Aktivität auch durch zwei weitere posttranslationelle Mechanismen. Zum einen wird Ste12 bei andauernder Pheromon-Exposition über den Ubiquitin-vermittelten Abbau degradiert (Esch et al., 2006). Zum anderen wird die Aktivität von Ste12 bei einem Pheromonsignal durch Sumoylierung gefördert (Wang and Dohlman, 2006). Die hierfür notwendigen Reste sind bislang allerdings nicht bekannt.

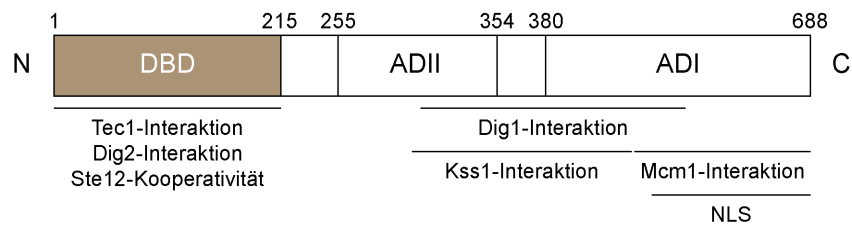


Abb. 3: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Ste12.

Im N-terminalen Bereich von Ste12 befindet sich eine DNA-Bindedomäne (DBD), von der bislang ausgegangen wird, dass sie einer Homöodomäne ähnelt. Diese Region wird zudem durch den Repressor Dig2 gebunden, um die DNA-Bindung von Ste12 zu verhindern und ist wichtig für die Tec1-Interaktion und Ste12-Kooperativität. Für die Transkriptionsaktivierung besitzt Ste12 die zwei Aktivierungsdomänen ADI und ADII. Diese überlappen teilweise mit dem Bereich, welcher für Interaktion mit dem Repressor Dig1 wichtig ist, welches so die Transkriptionsaktivierung durch Ste12 verhindert. Über den C-terminalen Bereich erfolgt zudem die Interaktion mit Kss1 und Mcm1. Darüber hinaus befindet sich im C-terminalen Bereich ein Kernlokalisierungssignal (NLS).

Der Transkriptionsfaktor Ste12 ist 688 Aminosäuren lang und besitzt eine N-terminale DNA-Bindedomäne (DBD; Aminosäuren 1-215; Abb. 3) (Errede and Ammerer, 1989; Dolan et al., 1989; Yuan and Fields, 1991; Kirkman-Correia et al., 1993). Aufgrund von Sequenzvergleichen wurde postuliert, dass die DBD von Ste12 einer Homöodomäne ähnelt (Yuan and Fields, 1991). Da die Struktur bislang nicht gelöst wurde, ist allerdings nicht bekannt, ob es sich bei der Ste12 DBD tatsächlich um eine Homöodomäne handelt. Der N-terminale Bereich wird neben der DNA-Bindung auch für die Ste12-Kooperativität, und für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Tec1 und dem Repressor Dig2 benötigt (Yuan and Fields, 1991; Chou et al., 2006). Neben der DBD besitzt Ste12 zwei Aktivierungsdomänen. In der zentralen Region von Ste12 befindet sich die Aktivierungsdomäne II (ADII, Aminosäuren 255-354), welche für die Pheromon-abhängige Transkriptionsaktivierung benötigt wird (Kirkman-Correia et al., 1993; Pi et al., 1997). Im C-terminalen Bereich lokalisiert die Aktivierungsdomäne I (ADI, Aminosäuren 380-688), welche sowohl für die Pheromon-abhängige, als auch für die basale Transkriptionsaktivierung benötigt wird (Kirkman-Correia et al., 1993; Pi et al., 1997). Der für die Interaktion mit dem Repressor Dig1 notwendige Bereich überlappt mit den beiden Aktivierungsdomänen (Olson et al., 2000). Die Interaktion mit der MAPK Kss1 erfolgt über die Aminosäuren 298-473 (Bardwell et al., 1998a). Für die Interaktion mit dem MADS-Box Transkriptionsfaktor Mcm1 wird der Bereich zwischen Aminosäure 470 und 688 benötigt (Errede and Ammerer, 1989). Im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 494-688) befindet sich zudem ein Kernlokalisierungssignal (NLS, „nuclear localization signal“) (Leslie et al., 2002).

1.4 Die Funktion und Struktur des Transkriptionsfaktors Tec1

Der Transkriptionsfaktor Tec1 gehört zur Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren (Andrianopoulos and Timberlake, 1991; Bürglin, 1991). Diese Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine hochkonservierte TEA-DNA-Bindedomäne (TEAD) aus, welche von Pilzen bis

zum Menschen zu finden ist. Die Bezeichnung TEA steht für die ersten zu dieser Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren, die durch T. R. Bürglin 1991 identifiziert wurden: Das aus *Homo sapiens* stammende TEF-1, das aus *S. cerevisiae* stammende Tec1, sowie AbaA aus *Aspergillus nidulans* (Bürglin, 1991). Die seltener verwendete Bezeichnung ATTS schließt neben AbaA, TEF-1 und Tec1 auch Scalloped aus *Drosophila melanogaster* ein (Andrianopoulos and Timberlake, 1991; Campbell et al., 1992). Die TEAD-Transkriptionsfaktoren sind an der Kontrolle der zellulären Differenzierung und Entwicklung beteiligt (Abb. 4).

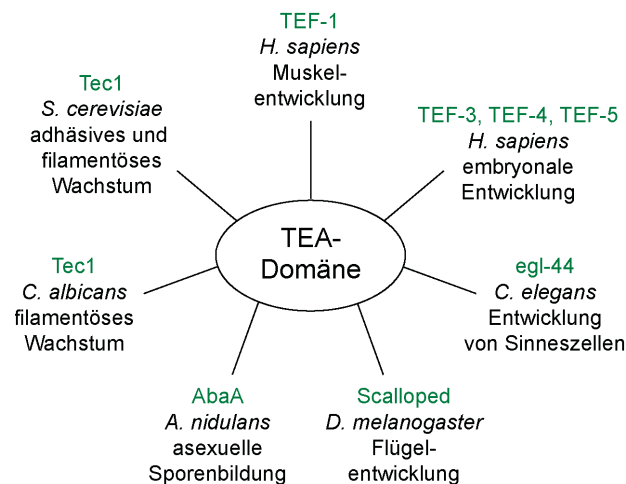


Abb. 4: Die Familie der TEA-Transkriptionsfaktoren.

Die Transkriptionsfaktoren mit der hochkonservierten TEA-DNA-Bindedomäne steuern vom Pilz bis hin zum Menschen die Differenzierung und Entwicklung. Außerhalb der TEA-Domäne finden sich jedoch keine Gemeinsamkeiten zwischen diesen Transkriptionsfaktoren. Dargestellt sind TEA-Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen eukaryotischen Modellorganismen, sowie ihre jeweilige Funktion bei der Kontrolle der Differenzierung und Entwicklung. Modifiziert nach Anbanandam et al., 2006.

In *S. cerevisiae* wurde Tec1 zunächst als Regulator für das Ty1-Retrotransposon identifiziert (Laloux et al., 1990). Später konnte gezeigt werden, dass es auch für die Kontrolle der Adhäsion und Pseudohyphenbildung benötigt wird (Gavrias et al., 1996). Auch in dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* ist Tec1 an der Kontrolle des filamentösen Wachstums beteiligt und ist somit wichtig für dessen Virulenz (Schweizer et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor AbaA aus dem Schimmelpilz *A. nidulans* kontrolliert die asexuelle Sporenbildung (Mirabito et al., 1989). In *D. melanogaster* wird Scalloped für die Kontrolle der Flügelentwicklung sowie der Entwicklung von Sinneszellen benötigt (Campbell et al., 1992; Halder et al., 1998). Bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist egl-44 an der Entwicklung von Sinneszellen beteiligt (Wu et al., 2001). Im Menschen sind bislang vier TEAD-Transkriptionsfaktoren bekannt, welche sich auch in anderen höheren Eukaryoten, wie *Mus musculus* und *Gallus gallus* finden: TEF-1, TEF-3, TEF-4, TEF-5. TEF-1 kontrolliert die Entwicklung von Herz-, Skelett- und

glatter Muskulatur und kann auch die Transkription viraler Gene, wie die des Simian-Virus 40 und des Papillomvirus 16 steuern (Mar and Ordahl, 1990; Xiao et al., 1991; Ishiji et al., 1992; Farrance and Ordahl, 1996; Hsu et al., 1996). TEF-3 findet sich hauptsächlich in Lunge und Leber, TEF-4 wird für die neuronale Entwicklung benötigt und TEF-5 ist in der Plazenta zu finden (Jacquemin et al., 1996, 1997; Jiang et al., 1999). Zur Transkriptionsaktivierung ihrer Zielgene binden die TEAD-Transkriptionsfaktoren über die TEAD in *S. cerevisiae* an TCS-Elemente („TEA/ATTS consensus sequence“) und in höheren Eukaryoten an M-CAT-Elemente („muscle-CAT“) mit der Konsensussequenz CATTCC/T (Madhani and Fink, 1997; Yoshida, 2008). In einer neueren Studie konnte die Sequenz auf R_MATTTCYY erweitert werden (Heise et al., 2010).

TEAD-Transkriptionsfaktoren weisen innerhalb der TEAD eine hohe Konservierung auf (44-99 %), sind sich ansonsten aber nicht sehr ähnlich (Bürglin, 1991; Campbell et al., 1992; Anbanandam et al., 2006). Dennoch finden sich funktionelle Überlappungen zwischen den verschiedenen TEAD-Transkriptionsfaktoren. So führt beispielsweise die Überexpression von AbaA in einem *tec1Δ*-Stamm zur Ausbildung von Pseudohyphen und auch Tec1 aus *C. albicans* kann in haploiden und diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen mit deletiertem *TEC1*-Gen die Adhäsion und Pseudohyphenbildung induzieren (Gavrias et al., 1996; Schweizer et al., 2000). Das humane TEF-1 kann zudem die Funktion von Scalloped bei der Flügelentwicklung übernehmen (Deshpande et al., 1997). Die TEAD-Transkriptionsfaktoren aus *D. melanogaster* und *Mammalia* sind zudem wichtige Komponenten des Hippo-Signalwegs. Er kontrolliert die Organgröße durch die Steuerung der Zellproliferation und Apoptose und seine Dysregulation steht vermutlich im Zusammenhang mit Krebs (Zhao et al., 2011; Varelas and Wrana, 2012). Der Transkriptionsfaktor Tec1 wird auf der Ebene der Transkription und Translation, sowie durch posttranslationelle Mechanismen reguliert. Eine sehr wichtige Rolle bei der Regulation von Tec1 nimmt der Transkriptionsfaktor Ste12 ein. Im *TEC1*-Promotor finden sich mehrere PREs und die Expression von *TEC1* wird durch Pheromon induziert (Oehlen and Cross, 1998; Brückner et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass Ste12 auch unter vegetativen Bedingungen sehr wichtig für die Expression von *TEC1* ist (Köhler et al., 2002). Neben der Regulation der *TEC1*-Expression durch Ste12, wurde ebenfalls ein autoregulatorischer Mechanismus beschrieben. Dabei bindet Tec1 kooperativ mit Ste12 an ein FRE („filamentation and invasion responsive element“), welches sich aus einem TCS und einem benachbarten PRE zusammensetzt (Madhani and Fink, 1997). Jedoch gibt es Hinweise, dass die *TEC1*-Expression größtenteils unabhängig von der Autoregulation erfolgt (Köhler et al., 2002).

Das zur Familie der PUF-Proteine („Pumilio and FBF“) gehörende RNA-Bindeprotein Mpt5 beeinflusst die Tec1-Proteinmenge negativ, indem es im untranslatierten Bereich (UTR, „untranslated region“) der *TEC1*-mRNA bindet und die Translation reprimiert (Prinz et al., 2007). Die Stabilität des Tec1-Proteins wird sowohl durch posttranslationelle Modifikationen, als auch durch die Bildung von Proteinkomplexen beeinflusst. Wie bereits zuvor beschrieben, wird Tec1 unter Konjugationsbedingungen abgebaut. Durch die Phosphorylierung an T273 und T276 wird Tec1 durch das F-Box Protein Cdc4 erkannt, welches als Adaptor-Untereinheit der E3-Ubiquitinligase SCF (Skp1, Cullin, F-Box) fungiert und die Substratspezifität vermittelt (Bao et al., 2004; Chou et al., 2004; Bao et al., 2010). Die Tec1-Stabilität wird positiv über die Proteine Tip1, Tap42 und Sit4 durch den TORK1 beeinflusst und die Zugabe von Rapamycin führt zum Abbau von Tec1, welcher von der E3-Ubiquitinligase Rsp5 abhängig ist (Brückner et al., 2011). Durch die Komplexbildung mit Ste12 wird die Stabilität des Tec1-Proteins ebenfalls positiv reguliert (Heise et al., 2010). Die Aktivität von Tec1 kann ebenfalls negativ beeinflusst werden. So hat die Sumoylierung an K54 einen negativen Effekt auf die Aktivität von Tec1, kann durch die Aktivierung der MAPK Kss1 aber verhindert werden (Wang and Dohlman, 2006; Wang et al., 2009).

Tec1 ist 486 Aminosäuren lang und besitzt neben den bereits genannten Phosphorylierungsstellen an T273 und T276, sowie der Sumoylierungsstelle an K54 verschiedene Domänen (Abb. 5). Im N-terminalen Bereich, zwischen den Aminosäuren 128 und 192, befindet sich die TEAD (Andrianopoulos and Timberlake, 1991; Bürglin, 1991). Die Struktur der TEAD wurde für TEF-1 aufgeklärt und weist eine starke Ähnlichkeit zu Homöodomänen auf (Anbanandam et al., 2006). Homöodomänen sind rund 60 Aminosäuren lang und besitzen drei α -Helices, welche ein „Helix-Loop-Helix-Turn-Helix“-Motiv ausbilden. Helix 1 und Helix 2 liegen antiparallel zueinander vor, während Helix 3 zwischen ihnen liegt und die DNA erkennt und bindet. Obwohl die Struktur der TEAD aus TEF-1 einer Homöodomäne ähnelt, handelt es sich um keine Homöodomäne. Die Aminosäuresequenz der TEAD unterscheidet sich stark von der Konsensussequenz der Homöodomänen und es ist keine funktionelle Komplementation zwischen einem TEAD-Transkriptionsfaktor und einem Transkriptionsfaktor mit einer Homöodomäne möglich (Anbanandam et al., 2006).

Bei der TEAD aus TEF-1 liegen Helix 1 und Helix 2 beinahe antiparallel zueinander vor und Helix 3 befindet sich in einen Winkel von ca. 100° zu Helix 1 und Helix 2 und vermittelt die DNA-Erkennung und -Bindung (Anbanandam et al., 2006).

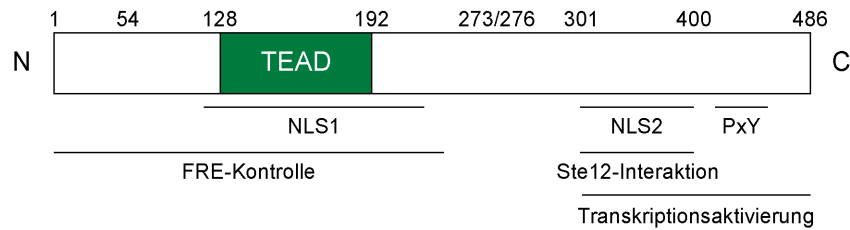


Abb. 5: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Tec1.

Im N-terminalen Bereich von Tec1 befindet sich die hochkonservierte TEAD, deren Struktur einer Homöodomäne ähnelt. Der N-terminale Bereich wird darüber hinaus auch für die FRE-Kontrolle benötigt. Die Interaktion mit den Transkriptionsfaktor Ste12 erfolgt über eine Region im C-terminalen Bereich. Hier findet sich zudem eine Domäne für die Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierung, sowie drei konservierte PxY Motive für die Interaktion mit Rsp5. Tec1 besitzt zwei NLS, die sich im C-terminalen Bereich (NLS1) bzw. N-terminalen Bereich (NLS2) befinden. Posttranslationelle Modifikationen erfolgen an K54 (Sumoylierung), sowie T273 und T276 (Phosphorylierung).

Ebenfalls im N-terminalen Bereich, zwischen den Aminosäuren 1 bis 157, findet sich eine Region, welche für die kooperative Transkriptionsaktivierung durch Ste12 und Tec1 über ein FRE ausreichend ist (Köhler et al., 2002). Die Interaktion mit der MAPK Fus3 erfolgt auch über den N-Terminus (Aminosäuren 1-280) (Brückner et al., 2004). In der C-terminalen Hälfte von Tec1 erfolgt die Interaktion mit Ste12 über einen Bereich zwischen den Aminosäuren 301 bis 400 (Chou et al., 2006). Da für die Transkriptionsaktivierung über die Bindung von Tec1 und Ste12 an ein FRE allerdings nur der N-terminale Bereich von Tec1 benötigt wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion zwischen Tec1 und Ste12 hier nicht zwingend notwendig ist und sie einzeln an ihr DNA-Motiv binden können (Köhler et al., 2002). Zwischen den Aminosäuren 406 und 455 befinden sich drei PxY Motive, welche für die Interaktion mit der E3-Ubiquitinligase Rsp5 benötigt werden (Brückner et al., 2011). Im C-terminalen Bereich findet sich ebenfalls eine Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 377-486), welche für die Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierung von Zielgenen über TCS-Elemente notwendig ist (Heise et al., 2010). Es finden sich ebenfalls zwei NLS zwischen den Aminosäuren 125 bis 240 (NLS1) und den Aminosäuren 301 bis 400 (NLS2). NLS2 überlappt mit der Ste12-Interaktionsdomäne, der NLS2-vermittelte Kerntransport ist aber nicht Ste12-abhängig (Kern, 2011).

1.5 Mechanismen der Zielgenkontrolle durch Ste12 und Tec1

Um ihre Programm-spezifischen Zielgene kontrollieren zu können, bilden Ste12 und Tec1 verschiedene Komplexe aus (Abb. 6). In Abwesenheit eines Pheromonsignals liegt Ste12 in einem inhibitorischen Komplex mit Dig1 und Dig2 vor (Cook et al., 1996; Tedford et al., 1997; Olson et al., 2000; Chou et al., 2006). Bei einem Pheromonsignal werden Ste12, Dig1 und Dig2 durch Fus3 und Kss1 phosphoryliert, was zur Freigabe von Ste12 führt. Daraufhin kann Ste12 die Transkription seiner Zielgene wie *FUS1* zum einen als Homodimer durch Bindung an

benachbarte PREs aktivieren (Abb. 6) (Errede and Ammerer, 1989; Dolan et al., 1989; Hagen et al., 1991; Yuan and Fields, 1991). Eine Aktivierung ist ebenfalls möglich, wenn sich ein PRE in unmittelbarer Nähe zu einer PRE-ähnlichen Sequenz befindet (Yuan and Fields, 1991). Zum anderen kann Ste12 Konjugations-spezifische Gene, wie den α -Faktor-Rezeptor *STE2* in *MATa*-Zellen durch kooperative Bindung mit Mcm1, welches an P-Box-Elemente bindet, kontrollieren (Errede and Ammerer, 1989; Primig et al., 1991).

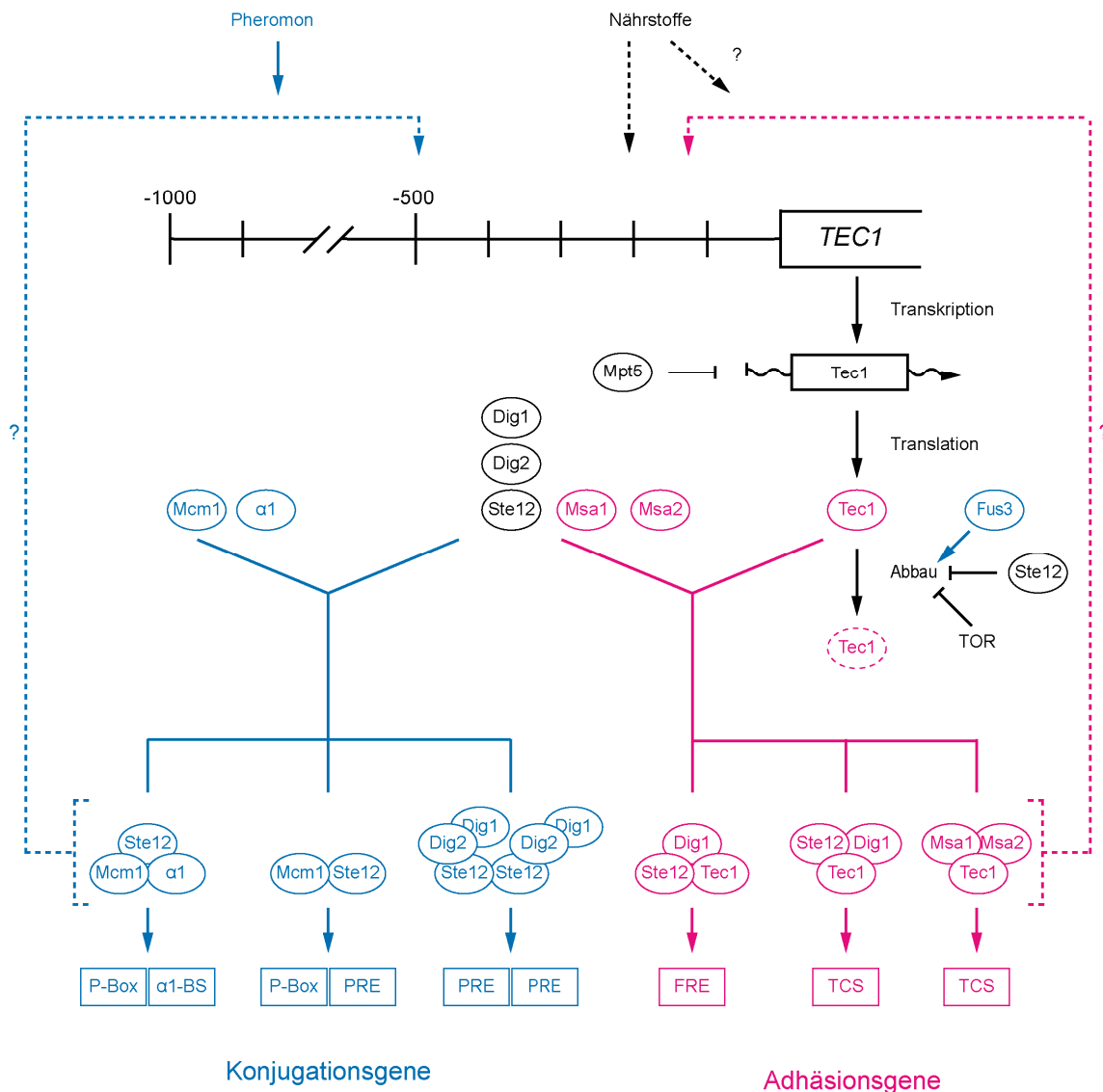


Abb. 6: Mechanismen zur Kontrolle der Expression von Konjugations- und Adhäsions-spezifischen Genen. Die beiden Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 sind zentrale Regulatoren von Konjugations- und Adhäsions-spezifischen Genen. Um ihre Zielgene zu regulieren, bilden sie eine Vielzahl distinkter Komplexe mit weiteren Transkriptionsfaktoren aus. Für die Kontrolle Konjugations-spezifischer Gene bildet Ste12 einen Komplex mit α 1 und/oder Mcm1, oder mit Dig1 und Dig2 aus. Für die Kontrolle Adhäsions-spezifischer Gene bildet Tec1 einen Komplex mit Ste12 und Dig1, oder mit Msa1 und Msa2 aus. Auch Tec1 wird auf transkriptioneller Ebene positiv durch Ste12 reguliert und kann seine Expression autoregulatorisch über ein FRE steuern. Es ist jedoch nicht genau bekannt, welche der Komplexe dabei an den *TEC1*-Promotor binden. Auf welche Weise Nährstoffe die Expression von *TEC1* beeinflussen ist bislang ebenfalls noch unklar.

Sowohl Ste12, als auch Mcm1 binden dabei an die DNA, allerdings kann nur Ste12 die Transkriptionsaktivierung vermitteln. In *MAT α* -Zellen interagiert Ste12 mit Mcm1 und α 1, um α -spezifische Gene wie den α -Faktor-Rezeptor *STE3* zu aktivieren (Bender and Sprague, 1987; Sengupta and Cochran, 1991; Yuan et al., 1993). Die DNA-Bindung erfolgt dabei durch Mcm1 und α 1, wohingegen Ste12 die Aktivierung vermittelt, da Mcm1 und α 1 die Transkription nicht aktivieren können (Hwang-Shum et al., 1991; Madhani, 2007). Hier interagiert Ste12 nicht mit der DNA, sondern wird durch die Interaktion mit α 1 rekrutiert.

Für die Kontrolle Adhäsions-spezifischer Gene kooperiert Ste12 mit Tec1 und die Promotoren dieser Gene sind vorwiegend durch den Ste12/Tec1/Dig1-Komplex gebunden (Abb. 6) (Madhani et al., 1997; Baur et al., 1997; Chou et al., 2006). Es wurde zunächst angenommen, dass die Regulation Adhäsions-spezifischer Gene über FREs erfolgt, an welche Ste12 und Tec1 gemeinsam binden. Jedoch finden sich in den meisten Promotoren dieser Gene nur TCS-Elemente und keine FREs (Chou et al., 2006). Bisher wurden FREs nur im Ty1-Retrotransposon, dem *TEC1*-Promotor und dem *FLO11*-Promotor gefunden (Madhani and Fink, 1997; Baur et al., 1997; Lo and Dranginis, 1998). Im Ty1-Retrotransposon beträgt der Abstand zwischen dem PRE und dem TCS-Element 14 bp, im *TEC1*-Promotor sind das PRE und TCS-Element umgekehrt im Vergleich zu dem Ty1-Retrotransposon und haben nur einen Abstand von 4 bp (Madhani and Fink, 1997). Im *FLO11*-Promotor weicht die Sequenz des PRE (TGCAACA) leicht von der Konsensussequenz ab (TGAAACA) und auch hier beträgt der Abstand zwischen dem PRE und dem TCS-Element 14 bp (Lo and Dranginis, 1998).

Da viele Adhäsions-spezifische Gene trotz fehlender FREs sowohl durch Ste12, als auch Tec1 gebunden werden, wird davon ausgegangen, dass Tec1 die DNA-Bindung vermittelt, während Ste12 für die Transkriptionsaktivierung zuständig ist (Zeitlinger et al., 2003; Chou et al., 2006). Neuere Studien zeigen allerdings, dass Tec1 auch ohne Ste12 an TCS-Elemente binden und Zielgene wie *FLO11* über seine C-terminale Aktivierungsdomäne aktivieren kann (Köhler et al., 2002; Heise et al., 2010). Dabei interagiert Tec1 mit den beiden Co-Aktivatoren Msa1 und Msa2, welche seine Aktivität fördern (van der Felden et al., 2014).

1.6 Das Tetrazyklin-regulierte Expressionssystem

Für *S. cerevisiae* wurde eine Reihe verschiedener Expressionssysteme entwickelt, welche beispielsweise für die Untersuchung der Funktion essentieller Gene genutzt werden können. Prominente Beispiele sind der *GALI*-Promotor, der *MET25*-Promotor und der *CUP1*-Promotor. Ein großer Nachteil dieser Promotoren ist allerdings, dass sie durch einen Wechsel der Kohlenstoffquelle oder die Zugabe von Substanzen, welche den Phänotyp möglicherweise

beeinflussen, reguliert werden. Als Alternative wurde ein System entwickelt, welches auf den Komponenten des bakteriellen Transposons Tn10 beruht, das die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin vermittelt: Die tet-Operatorsequenz (tetO) und der Tetrazyklin-regulierte Repressor (tetR) (Kleckner et al., 1975; Wray et al., 1981). Die tetO-Sequenz ist ein Palindrom, bestehend aus 19 bp und wird durch die N-terminale DNA-Bindedomänen eines tetR-Dimers gebunden (Hillen et al., 1983; Sizemore et al., 1990; Wissmann et al., 1991; Baumeister et al., 1992). Die zentrale Domäne bindet das Tetrazyklin und ermöglicht die Dimerisierung (Hinrichs et al., 1994; Aleksandrov et al., 2008).

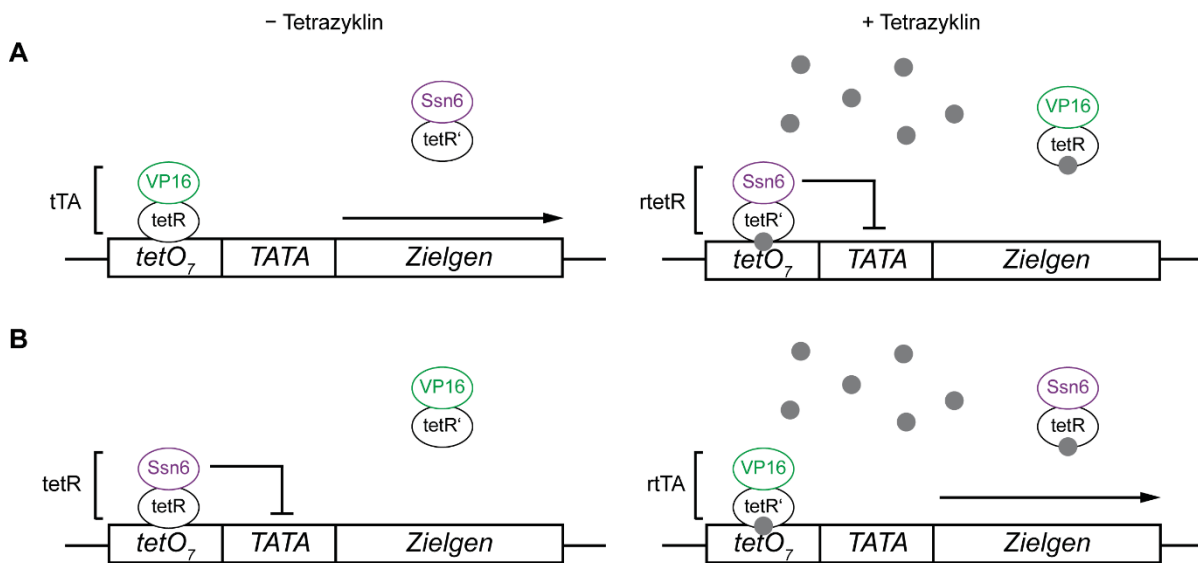


Abb. 7: Das duale Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem für *S. cerevisiae*.

(A) Direktes duales Tetrazyklin-regulierbares Expressionssystem. Bei dem dualen direkten Tetrazyklin-regulierten Expressionssystem kann der Tetrazyklin-regulierbare Transaktivator (tTA), welcher eine Fusion aus dem Tetrazyklin-regulierbaren Repressor (tetR) und der VP16 Aktivierungsdomäne ist, in Abwesenheit von Tetrazyklin an die tetO-Sequenz binden und die Transkription aktivieren. Die Zugabe von Tetrazyklin hat die Dissoziation des tTA und die Bindung des rtetR zur Folge, welcher aus einem mutierten tetR (tetR') und Ssn6 besteht und die Transkription inhibiert. (B) Reverses duales Tetrazyklin-regulierbares Expressionssystem. Im reversen dualen System ist der tTA mutiert (rtTA) und kann in Abwesenheit von Tetrazyklin nicht binden. Durch die Bindung des tetR wird die basale Transkription verhindert. Die Zugabe von Tetrazyklin führt zur Dissoziation des tetR und der rtTA bindet an die tetO-Sequenz und induziert die Transkription.

Zunächst wurde ein direktes System für die Nutzung in humanen Zelllinien entwickelt. Um einen Tetrazyklin-regulierbaren Transaktivator (tTA) zu generieren, wurde an den tetR die Aktivierungsdomäne des „Virion-Protein 16“ (VP16) aus dem *Herpes simplex*-Virus fusioniert (Gossen and Bujard, 1992). Dieser kann in Abwesenheit von Tetrazyklin an den tetO binden und die Transkription aktivieren. Die Zugabe von Tetrazyklin führt hingegen zu seiner Dissoziation von der DNA und verhindert so die Transkriptionsaktivierung.

Für das reverse System wurde der tTA mutiert (rtTA), sodass er in Anwesenheit von Tetrazyklin an den tetO binden und die Transkription aktivieren kann (Gossen et al., 1995). Um das Tetrazyklin-regulierte Expressionssystem in *S. cerevisiae* nutzen zu können, wurden die

tet-Operatoren stromaufwärts der TATA-Region aus dem *CYC1*-Promotor platziert (Garí et al., 1997). Eine weitere Verbesserung des direkten und des reversen Systems für die Verwendung in Hefe ist die Entwicklung des direkten und des reversen dualen Systems (Abb. 7) (Bellí et al., 1998). Im direkten dualen System kann der tTA in Abwesenheit von Tetrazyklin an den tetO binden und die Transkription aktivieren. Die Zugabe von Tetrazyklin führt in diesem System zu Dissoziation des tTA und der Bindung eines Tetrazyklin-aktivierbaren Repressor, welcher mit dem generellen Co-Repressor Ssn6 fusioniert wurde und die Transkription inhibiert (rtetR) (Bellí et al., 1998). Im reversen dualen System bindet der Repressor tetR hingegen in Abwesenheit von Tetrazyklin an den tetO, um die Transkription zu inhibieren. Hier führt die Zugabe von Tetrazyklin zur Dissoziation des tetR-Ssn6, der reverse Tetrazyklin-regulierte Aktivator rtTA kann binden und die Transkription aktivieren. In der Regel wird das Tetrazyklin-Derivat Doxyzyklin statt Tetrazyklin verwendet, da es effektiver wirkt und besser durch den tetR gebunden wird (Degenkolb et al., 1991; Garí et al., 1997).

1.7 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die transkriptionelle und translationelle Regulation des Transkriptionsfaktors Tec1 näher charakterisiert werden. Vorangegangene Studien haben einerseits gezeigt, dass die Expression von *TEC1* vermutlich autoregulatorisch über ein FRE und durch Ste12 über mehrere PREs erfolgt. Andererseits wird das Tec1-Protein aber als Reaktion auf ein Pheromonsignal abgebaut. Deshalb waren die zentralen Fragen dieser Arbeit, welche Rolle die beiden transkriptionellen Regelkreise bei der *TEC1*-Kontrolle spielen und weshalb die *TEC1*-Expression durch Pheromon induziert, die Tec1-Proteinmenge aber reduziert wird. Hierfür sollte auch untersucht werden, welche Umweltreize als potentielle Aktivatoren der *TEC1*-Expression fungieren und über welchen Regelkreis diese Aktivierung erfolgt. Des Weiteren sollte die Ste12-vermittelte Kontrolle der *TEC1*-Expression durch eine synthetische, Doxyzyklin-vermittelte Kontrolle ersetzt werden.

Da frühere Arbeiten andeuteten, dass der Verlust der MAPKK Ste7 keinen Einfluss auf die Expression von *TEC1-YFP* hat, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, inwieweit die C-terminale Markierung mit YFP die Transkription und Translation von *TEC1* beeinflusst. Insgesamt sollte diese Arbeit ein besseres Verständnis der Funktion genetischer Regelkreise ermöglichen und die gewonnenen Erkenntnisse für die zukünftige Erstellung eines quantitativen Modells des Fus3/Kss1-MAPK Moduls genutzt werden, um die Entwicklung synthetischer Module zu ermöglichen.

2 Ergebnisse

2.1 Transkriptionelle Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 unter Konjugationsbedingungen und verschiedenen Stressbedingungen

2.1.1 Identifizierung der PREs und TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor

Frühere Arbeiten haben Hinweise ergeben, dass die Expression von *TEC1* über zwei Regelkreise gesteuert werden kann. Zum einen kann Tec1 gemeinsam mit Ste12 seine Expression autoregulatorisch über ein FRE steuern, zum anderen wird die Expression durch Ste12 über PREs kontrolliert (Madhani and Fink, 1997; Oehlen and Cross, 1998). Im Widerspruch dazu finden sich aber auch Hinweise, dass Tec1 selbst nicht für die Kontrolle seiner Expression benötigt wird und Tec1, trotz Pheromon-induzierter Transkription, bei der Konjugation abgebaut wird (Köhler et al., 2002; Bao et al., 2004; Brückner et al., 2004; Chou et al., 2004). Welche Rolle die beiden Regelkreise spielen, ist bislang nicht genauer bekannt. Um ihre Funktionen näher charakterisieren zu können, sollten Mutanten generiert werden, in welchen die beiden Schaltkreise einzeln oder gemeinsam durch Mutation der Tec1- und Ste12-Bindestellen im *TEC1*-Promotor inaktiviert sind.

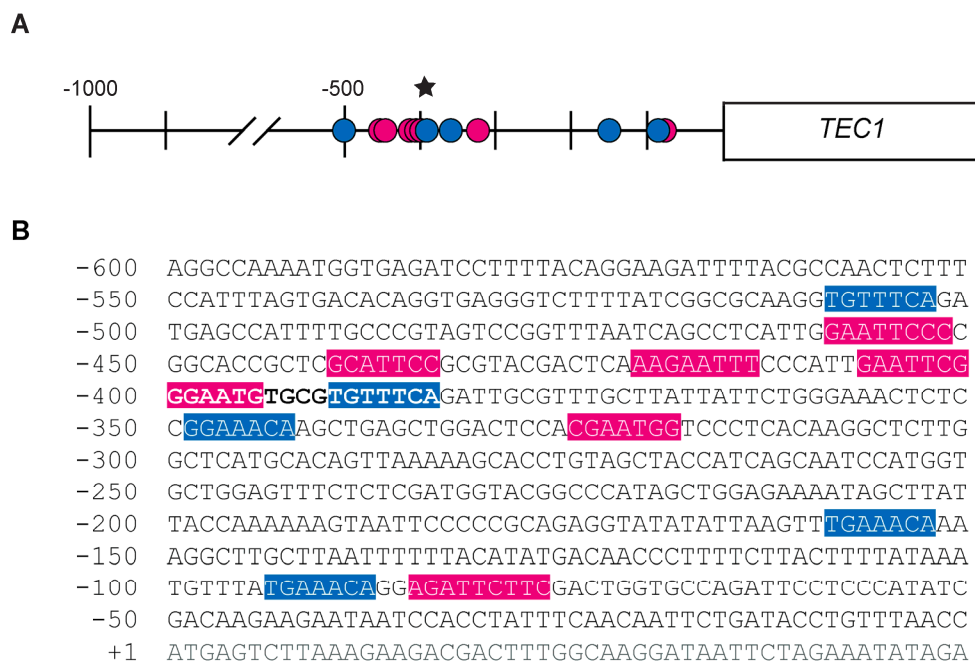


Abb. 8: PREs und TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor.

(A) Schematische Darstellung der Lage der PREs und TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor des Laborstamms S288c. Durch eine bioinformatische Analyse konnten fünf PREs (blau) und sieben TCS-Elemente (rot) identifiziert werden. Zudem befindet sich ein FRET (Stern) im *TEC1*-Promotor, welches sich aus einem der PREs und einem der TCS-Elemente zusammensetzt. (B) Sequenz des *TEC1*-Promotors aus dem Laborstamm S288c. Gezeigt sind die Positionen der PREs und TCS-Elemente sowie des FRET (fett) und des Startcodons (unterstrichen) im Bereich -600 bis -1. Die Farben der Bindestellen entsprechen den Angaben in (A).

Durch eine bioinformatische Analyse des *TEC1*-Promotors sollten zunächst alle PREs und TCS-Elemente identifiziert werden. Hierfür wurde zum einen in der Literatur nach bereits bekannten Ste12- und Tec1-Bindestellen im etwa 1000 bp großen *TEC1*-Promotor gesucht. Zum anderen wurde die Sequenz des *TEC1*-Promotors aus den Laborstämmen S288c und Σ 1278b mit Hilfe der „UniPROBE“ Datenbank (Hume et al., 2015) und der „Yeasttract“ Datenbank (Teixeira et al., 2006; Monteiro et al., 2008; Abdulrehman et al., 2011; Teixeira et al., 2014) analysiert. Die in der „*Saccharomyces* Genome Database“ (<http://yeastgenome.org/>) erfassten Bindestellen im *TEC1*-Promotor wurden ebenfalls berücksichtigt.

Bei der Analyse des *TEC1*-Promotors konnten im Laborstamm S288c insgesamt fünf PREs und sieben TCS-Elemente identifiziert werden (Abb. 8). Des Weiteren wurde ein FRE gefunden, welches sich aus einem der fünf PREs und einem der sieben TCS-Elemente zusammensetzt. Die PREs befinden sich an den Positionen –88 bis –94 (PRE I) (Oehlen and Cross, 1998; Chou et al., 2006; MacIsaac et al., 2006), –153 bis –159 (PRE II) (Oehlen and Cross, 1998; Chou et al., 2006; MacIsaac et al., 2006), –343 bis –349 (PRE III) (Oehlen and Cross, 1998; MacIsaac et al., 2006), –384 bis –390 (PRE IV) (Madhani and Fink, 1997; Oehlen and Cross, 1998; Chou et al., 2006; MacIsaac et al., 2006) und –503 bis –509 (PRE V) (Oehlen and Cross, 1998; Chou et al., 2006; MacIsaac et al., 2006) stromaufwärts des ATG Startcodons (Abb. 8 B). Mit Ausnahme des PRE an Position –343 bis –349 stimmt die Sequenz der PREs mit der Konsensussequenz TGAAACA überein (Kronstad et al., 1987; Dolan et al., 1989; Yuan and Fields, 1991; Oehlen and Cross, 1998). Bei dem PRE an Position –343 bis –349 findet sich anstelle des T ein G (Oehlen and Cross, 1998). Dieses T ist vermutlich nicht essentiell für die Ste12-Bindung (Su et al., 2010). Somit handelt es sich hierbei vermutlich um ein niederaffines PRE. Im Laborstamm Σ 1278b weicht die Sequenz des PREs an Position –153 bis –159 von der Sequenz des PREs im Laborstamm S288c ab. In Σ 1278b befindet sich an der Stelle des C ein A, gefolgt von der Insertion eines weiteren A. Hierbei handelt es sich vermutlich nicht um ein PRE, sondern um ein PRE-ähnliches Element. Des Weiteren findet sich an der Position –979 ein T im *TEC1*-Promotor von Σ 1278b, wohingegen in S288c ein G an Position –978 zu finden ist. Die TCS-Elemente befinden sich an den Positionen –78 bis –85 (TCS I) (Heise et al., 2010), –319 bis –325 (TCS II) (MacIsaac et al., 2006), –394 bis –400 (TCS III) (Madhani and Fink, 1997; Oehlen and Cross, 1998; MacIsaac et al., 2006), –401 bis –407 (TCS IV) (Harbison et al., 2004), –414 bis –421 (TCS V) (Zhu et al., 2009), –434 bis –440 (TCS VI) (MacIsaac et al., 2006) und –452 bis –459 (TCS VII) (Zhu et al., 2009) stromaufwärts des ATG Startcodons. Bei den TCS-Elementen an den Positionen –394 bis –400, –414 bis –421 und –452 bis –459 handelt es sich um hochaffine TCS-Elemente, welche Ste12-unabhängig durch Tec1 gebunden

werden können (Heise et al., 2010). Bei dem TCS-Element an der Position –78 bis –85 hingegen handelt es sich um ein niederaffines TCS-Element, welches Ste12-abhängig durch Tec1 gebunden wird (Heise et al., 2010). Das FRE befindet sich an der Position –384 bis –400 und der Abstand zwischen dem PRE und dem TCS-Element beträgt 4 bp (Madhani and Fink, 1997).

Die Transkriptionsaktivierung durch Ste12 erfolgt entweder durch Bindung als Homodimer an PREs oder als Heterodimer mit Tec1 oder Mcm1 und $\alpha 1$ (Sengupta and Cochran, 1991; Yuan et al., 1993; Madhani and Fink, 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich die entsprechenden Bindestellen in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Konfiguration der PREs einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hat (Su et al., 2010). Liegen PREs nahe beisammen, müssen sie repetitiv oder in entgegengesetzter Orientierung („tail-to-tail“) vorliegen, damit eine Transkriptionsaktivierung erfolgen kann. Beträgt der Abstand mindestens 40 bp, müssen sie in aufeinander zulaufender Orientierung („head-to-head“) oder in entgegengesetzter Orientierung vorliegen. Auch im *TEC1*-Promotor variieren die Orientierung und der Abstand zwischen den fünf PREs (Abb. 8). Hier sind PRE I, PRE II und PRE III repetitiv und der Abstand zwischen PRE I und PRE II beträgt 58 bp und zwischen PRE II und PRE III 183 bp. PRE IV ist entgegengesetzt zu PRE III orientiert und der Abstand zwischen PRE III und PRE IV beträgt 34 bp. PRE IV ist zudem Teil des FREs. Das PRE V hat die gleiche Orientierung wie PRE IV und der Abstand zwischen diesen beiden PREs beträgt 112 bp. Somit befinden sich die PREs im *TEC1*-Promotor nicht in einer optimalen Konfiguration, um eine effiziente Transkriptionsaktivierung zu ermöglichen. Lediglich die Konfiguration von PRE III und IV erlaubt vermutlich eine Transkriptionsaktivierung. Hierbei könnte die dazwischen liegende DNA gekrümmt werden, um die Bindung eines Homodimers zu gewährleisten.

2.1.2 *In vitro* Interaktion von Tec1 und Ste12 am *TEC1*-Promotor

Basierend auf der bioinformatischen Analyse wurden synthetische *TEC1*-Promotorvarianten generiert, in welchen entweder die TCS-Elemente, die PREs oder beide Elemente mutiert waren. Um die Bindung von Tec1 an die TCS-Elemente zu verhindern, wurde die Konsensussequenz CATTCC/T durch Einbringen zweier Punktmutationen zu CAaaCC/T geändert. Um die Bindung von Ste12 an die PREs zu verhindern, wurde die Konsensussequenz TGAAACA zu acttACA mutiert. Es konnte bereits in früheren Studien erfolgreich gezeigt werden, dass diese Mutationen die Bindung von Tec1 bzw. Ste12 an TCS-Elemente bzw. PREs verhindern (Madhani and Fink, 1997; Heise et al., 2010). Diese synthetischen

Promotorvarianten wurden dann genutzt, um Plasmide zu konstruieren, in denen das *TEC1*-Gen durch die verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten kontrolliert wird (vergleiche Tab. 9). Die Bindung von Tec1 und Ste12 an diese *TEC1*-Promotorvarianten wurde *in vitro* mittels eines elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) untersucht. Hierfür wurden MBP-Tec1-FLAG (im Folgenden als Tec1 bezeichnet) und MBP-Ste12-FLAG (im Folgenden als Ste12 bezeichnet) heterolog exprimiert und aufgereinigt. Aus den Plasmiden mit den verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten wurde der Bereich, welcher die TCS-Elemente und PREs enthält, per PCR amplifiziert und mit Cyanin 5.5 (Cy 5.5) markiert.

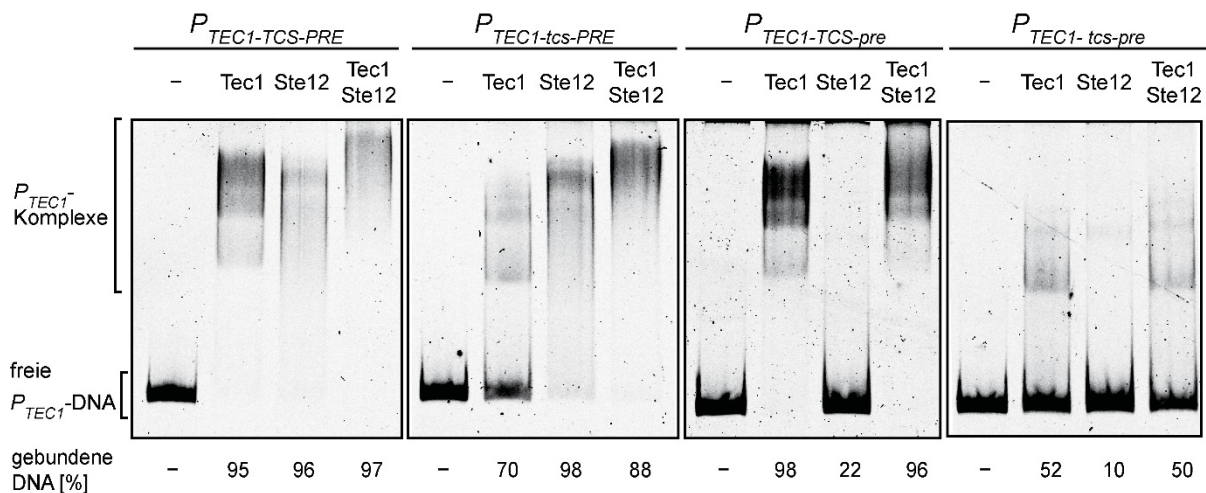


Abb. 9: *In vitro* Interaktion von Tec1 und Ste12 mit den *TEC1*-Promotorvarianten.

Die Bindung von Tec1 und Ste12 an die synthetischen Promotoren wurde mittels eines Gelretardierungsexperiments (EMSA) untersucht. Hierfür wurde eine 509 bp lange Region des *TEC1*-Promotors mit den angegebenen Mutationen in einer PCR aus den Plasmiden BHUM2053 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$), BHUM2054 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$), BHUM2055 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$) und BHUM2056 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$) amplifiziert und mit Cy 5.5 markiert. MBP-*TEC1*-FLAG (Tec1, BHUM0388) und MBP-*STE12*-FLAG (Ste12, BHUM0389) wurden in *Escherichia coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Für die Interaktion von Tec1 und Ste12 mit den *TEC1*-Promotorvarianten wurden 80 fmol Cy 5.5 markierte DNA ohne (–) oder mit 3,3 pmol Tec1 und/oder 5,1 pmol Ste12 inkubiert. Die Protein-DNA Komplexe wurden auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für die Quantifizierung der Komplexbildung zwischen Tec1 und Ste12 mit den P_{TEC1} -Fragmenten wurde das Verhältnis von gebundener DNA zur Gesamt-DNA gebildet und mit 100 multipliziert, um den prozentualen Anteil der gebundene DNA anzugeben.

In allen Ansätzen ohne Protein (–) war das Laufverhalten der DNA unverändert (Abb. 9). Im Gegensatz dazu konnten Tec1 und Ste12 sowohl einzeln, als auch gemeinsam, mehrere Komplexe mit einem nativen $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -Fragment bilden. Die Ausbildung mehrerer Komplexe ist vermutlich dadurch bedingt, dass die verwendeten DNA-Fragmente mehr als eine Bindestelle für Tec1 bzw. Ste12 enthalten. Somit können mehrere Komplexe mit einer variierenden Anzahl an besetzten Bindestellen gebildet werden.

Die Mutation der TCS-Elemente hatte einen Einfluss auf die Bindung von Tec1 an das $P_{TEC1-tcs-PRE}$ -Fragment (Abb. 9). Es konnte zwar die Ausbildung mehrerer Komplexe beobachtet werden, jedoch unterschied sich das Laufverhalten dieser Komplexe von dem der Komplexe

mit dem nativen *P_{TEC1-TCS-PRE}*-Fragment und es wurden nur 70 % der DNA gebunden. Die Bindung von Ste12 an das *P_{TEC1-tcs-PRE}*-Fragment wurde durch die Mutation der TCS-Elemente nicht beeinträchtigt, da die DNA komplett gebunden wurde. Im Ansatz mit Tec1 und Ste12 konnte ein minimal verändertes Laufverhalten der Komplexe beobachtet werden. Die Mutation der PREs hatte, im Vergleich zur Mutation der TCS-Elemente, einen noch stärkeren Einfluss auf die Interaktion von Ste12 mit dem *P_{TEC1-TCS-pre}*-Fragment, da keine Komplexbildung beobachtet werden konnte (Abb. 9). Auch die Komplexbildung in einem Ansatz mit Tec1 und Ste12 scheint beeinträchtigt zu sein, da sich das Laufverhalten dieser Komplexe von dem der Komplexe mit dem nativen *P_{TEC1-TCS-PRE}*-Fragment unterschied. Waren beide Promotorelemente mutiert, korrelierten die beobachteten Effekte teilweise mit den für das *P_{TEC1-tcs-PRE}*- und das *P_{TEC1-TCS-pre}*-Fragment beobachteten Effekten (Abb. 9). Auch hier konnte immer noch eine Komplexbildung zwischen Tec1 und dem *P_{TEC1-tcs-pre}*-Fragment beobachtet werden. Jedoch unterschied sich das Laufverhalten dieser Komplexe von dem der Komplexe mit dem *P_{TEC1-tcs-PRE}*-Fragment und hier waren nur noch 52 % der DNA gebunden. Analog zu den Beobachtungen für das *P_{TEC1-TCS-pre}*-Fragment konnte Ste12 nicht an ein *P_{TEC1-tcs-pre}*-Fragment binden und das Laufverhalten der Komplexe in einem Ansatz mit Tec1 und Ste12 war vergleichbar zum Laufverhalten der Komplexe im Ansatz mit Tec1 (Abb. 9).

Mittels einer Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) sollte untersucht werden, inwieweit die Mutation der beiden Promotorelemente *in vivo* die Bindung von Tec1 und Ste12 an den *TEC1*-Promotor beeinträchtigt. Da in diesem Fall eine Autoregulation untersucht werden sollte, mussten Hefestämme mit zwei *TEC1*-Kopien generiert werden. Eine dieser Kopien sollte unter Kontrolle der verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten stehen, die andere sollte unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors sein und eine HA-Markierung tragen, um eine Immunopräzipitation durchführen zu können. Jedoch gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, einen Stamm zu generieren, in dem der native *TEC1*-Promotor durch einen regulierbaren Promotor ersetzt werden konnte.

2.1.3 Effekt der mutierten TCS-Elemente und PREs auf die Flo11-abhängige Adhäsion an eine Agar-Oberfläche

In einem nächsten Schritt sollte bestimmt werden, welchen phänotypischen Effekt die Mutation der TCS-Elemente und PREs im *TEC1*-Promotor haben. Hierzu wurde die Flo11-vermittelte Adhäsion an eine Agar-Oberfläche mittels eines Waschttests bestimmt (Abb. 10). Während der *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Stamm eine starke Adhäsion aufwies, war die Adhäsion der *tec1Δ*-Mutante und der *ste12Δ*-Mutante stark reduziert.

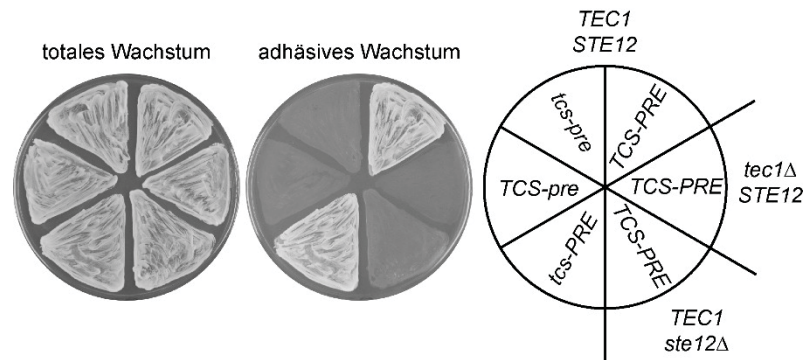


Abb. 10: Bestimmung der Flo11-abhängigen Adhäsion an Agar mittels Waschtest.

Um das adhäsive Wachstum zu bestimmen, wurden die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM0680 ($TEC1 ste12\Delta$) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 ($tec1\Delta STE12$), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1 STE12}$) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1 STE12}$) für fünf Tage auf YEPD-Agar angezogen und die Platten vor (totales Wachstum) und nach der Entfernung nicht-adhäsiver Zellen (adhäsives Wachstum) fotografiert.

Entgegen den Erwartungen zeigte die $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante eine starke Adhäsion, welche vergleichbar zum Kontrollstamm war. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu der beobachteten, reduzierten *in vitro* DNA-Bindung von Tec1 an ein $P_{TEC1-tcs-PRE}$ -Fragment. Die Adhäsion in der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ - und der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante war hingegen stark reduziert und korrelierte mit den bei der *in vitro* Analyse beobachteten Effekten.

2.1.4 Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 während der Konjugation

Auf den durch die *in vitro* Analyse und den Waschtest gewonnenen Erkenntnissen aufbauend, sollte der Einfluss der beiden Regelkreise auf die *TEC1*-Expression näher charakterisiert werden. Es sollte bestimmt werden, ob es Bedingungen gibt, unter denen nur die Regulation durch Tec1 oder nur die Regulation durch Ste12 relevant ist. In *S. cerevisiae*-Stämmen, in denen *TEC1* unter Kontrolle der synthetischen *TEC1*-Promotorvarianten ist, wurden die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmenge, sowie die *FLO11*-Transkriptmenge mittels quantitativer Real-Time PCR und Western-Analyse unter Kontrollbedingungen und den folgenden Stresssituationen gemessen: In Anwesenheit von α -Faktor (Kapitel 2.1.4), unter Glukosemangel (Kapitel 2.1.5), unter Stickstoffmangel (Kapitel 2.1.6), in Anwesenheit von 3-Aminotriazol (Kapitel 2.1.7) und in Anwesenheit von Natriumchlorid (Kapitel 2.1.8).

2.1.4.1 Die Pheromon-abhängige *TEC1*-Expression wird durch den Ste12-abhängigen Regelkreis vermittelt

Wie erwartet führte die Zugabe von α -Faktor im $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm zu einer vierfachen Erhöhung der *TEC1*-Transkriptmenge (Oehlen and Cross, 1998) und die $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante zeigte ein zum Kontrollstamm vergleichbares Verhalten mit einer rund dreifachen Erhöhung der *TEC1*-Transkriptmenge (Abb. 11 A). Dies lässt darauf schließen, dass

die TCS-Elemente nicht essentiell für die *TEC1*-Expression sind. Im Gegensatz hierzu war die *TEC1*-Transkriptmenge in der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante vierfach und in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante zweifach im Vergleich zum $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm reduziert und nahm auch bei der Zugabe von α -Faktor nicht zu. Hierbei lagen die gemessenen Werte für die $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante etwas über den Werten für die $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante und sind vergleichbar mit den für eine *ste12Δ*-Mutante erhaltenen Werten.

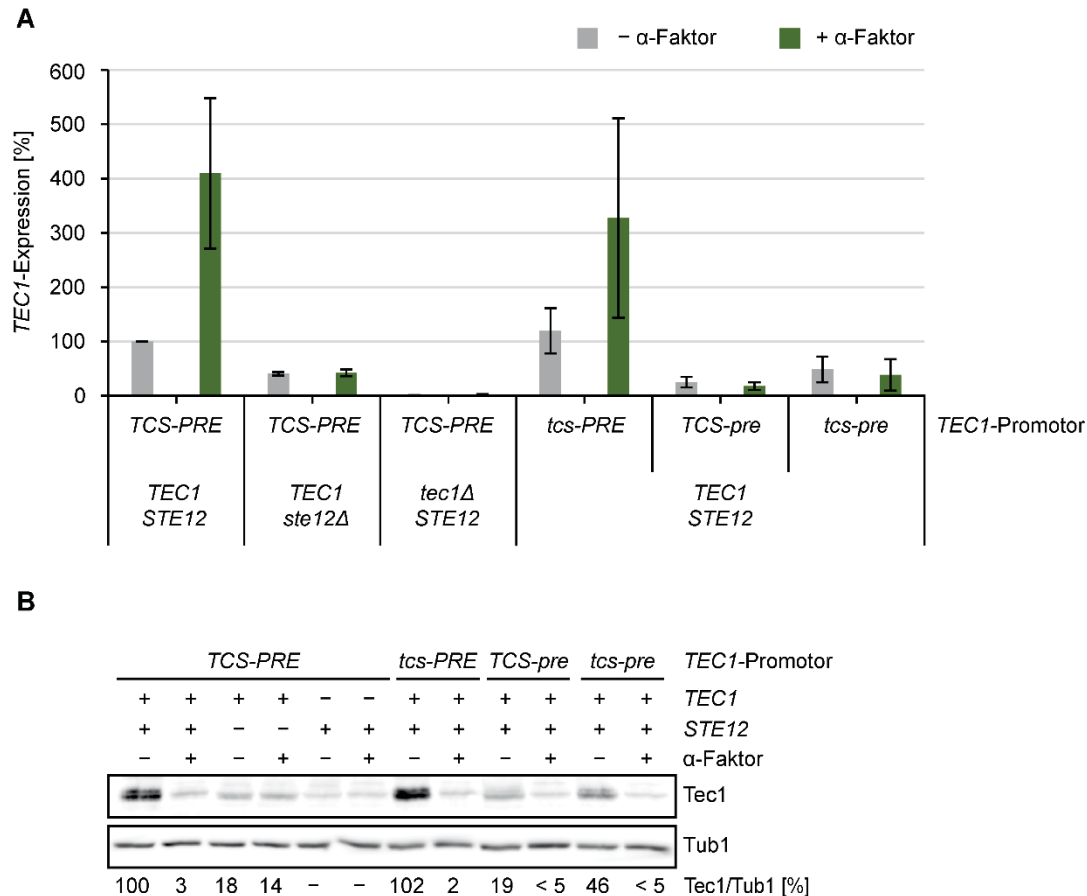


Abb. 11: Der Ste12-abhängige Regelkreis vermittelt die Pheromon-abhängige *TEC1*-Expression.

(A) Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der *TEC1*-Expression. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ *STE12*), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ *STE12*), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ *STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ *STE12*) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten mit Methanol (– α -Faktor) oder 1 μ M α -Faktor (+ α -Faktor) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm an.

Diese Beobachtungen stützen nicht nur frühere Vermutungen, dass die PREs im *TEC1*-Promotor an der transkriptionellen Kontrolle von *TEC1* beteiligt sind (Oehlen and Cross, 1998),

sondern zeigen auch, dass sie bereits für die Expression von *TEC1* unter vegetativen Bedingungen essentiell sind. In Abwesenheit von Pheromon korrelierte die Tec1-Proteinmenge mit den gemessenen *TEC1*-Transkriptmengen (Abb. 11 B). Auch hier war die Tec1-Proteinmenge in der $P_{TEC1-tcs-pre}$ -*TEC1*-Mutante mit 46 % 2,4-fach erhöht im Vergleich zu der $P_{TEC1-TCS-pre}$ -*TEC1*-Mutante mit 19 %. Sie waren sogar höher als in der *ste12Δ*-Mutante, in welcher 18 % Tec1 gemessen wurde. In Einklang mit früheren Daten war die Tec1-Proteinmenge bei Zugabe von α -Faktor im $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -*TEC1*-Kontrollstamm um das 33-fache reduziert (Bao et al., 2004; Brückner et al., 2004). Dieser α -Faktor-induzierte Abbau von Tec1 konnte auch in den *S. cerevisiae*-Stämmen mit den synthetischen *TEC1*-Promotorvarianten beobachtet werden.

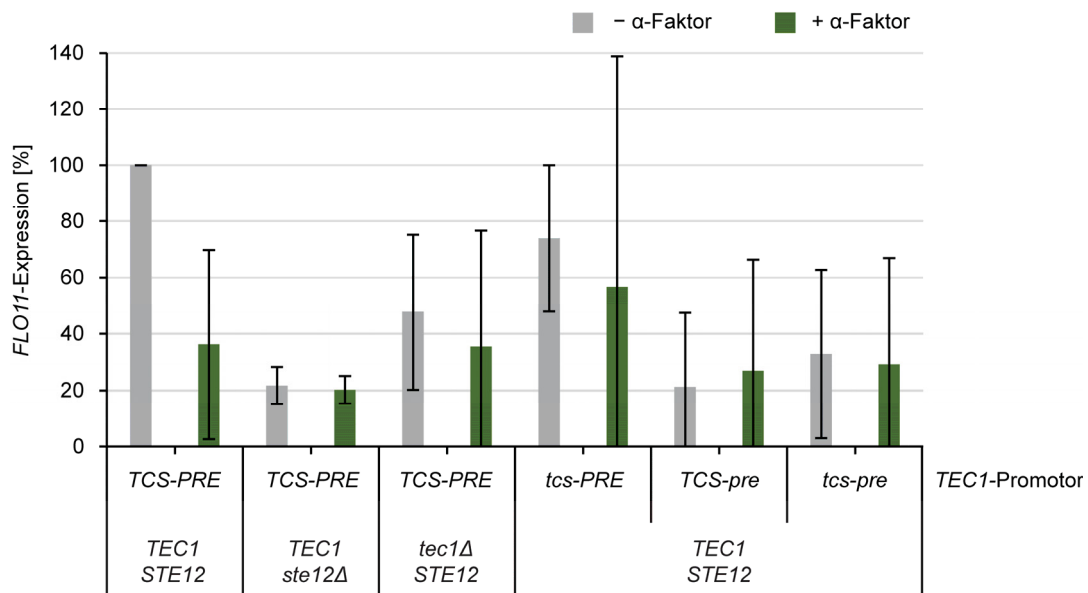


Abb. 12: Die *FLO11*-Expression ist abhängig von Tec1 und wird negativ durch Pheromon beeinflusst.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE}$ -*TEC1* *STE12*), YHUM0680 (*TEC1* *ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ* *STE12*), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE}$ -*TEC1* *STE12*), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre}$ -*TEC1* *STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre}$ -*TEC1* *STE12*) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten mit Methanol (– α -Faktor) oder 1 μ M α -Faktor (+ α -Faktor) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen und die *FLO11*-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -*TEC1*-Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Wie Brückner et al. (2004) bereits gezeigt haben, führte die Zugabe von Pheromon zu einer 2,5-fachen Reduktion der *FLO11*-mRNA-Menge im $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -*TEC1*-Kontrollstamm (Abb. 12). Die *FLO11*-Transkriptmengen der $P_{TEC1-tcs-PRE}$ -*TEC1*-, $P_{TEC1-TCS-pre}$ -*TEC1*- und $P_{TEC1-tcs-pre}$ -*TEC1*-Mutanten korrelierten mit der Tec1-Proteinmenge. Jedoch kann aufgrund der hohen Standardabweichung keine genaue Aussage über den Einfluss von α -Faktor auf die *FLO11*-Expression getroffen werden.

2.1.4.2 Analyse der *TEC1*-Regulationsdynamik auf Einzelzelebene mittels *CFP**-Reportergenen

Bei den durch quantitative Real-Time PCR und Western-Analyse gewonnenen Erkenntnissen über die Regulation der *TEC1*-Expression handelt es sich um Populationsmessungen aus Zellextrakten. Um die *TEC1*-Expression auch in einzelnen lebenden Zellen beobachten zu können, sollten *S. cerevisiae*-Stämme mit Fluoreszenz-Reportergenen unter Kontrolle der verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten verwendet werden. Diese Reportergene ermöglichen es zudem, dass nicht nur der Einfluss der *cis*-wirkenden Elemente (TCS-Elemente und PREs), sondern auch der Einfluss der *trans*-wirkenden Elemente (Tec1 und Ste12) auf die *TEC1*-Expression bestimmt werden kann.

In vorangegangenen Arbeiten wurde ein Fluoreszenzmikroskopie-basiertes System aufgebaut, um die Signalverarbeitung im Fus3/Kss1-MAPK-Modul in lebenden Zellen analysieren zu können (Weisser, 2009, 2011; Fries, 2012; van der Felden, 2012). Hierfür wurden modular aufgebaute, transkriptionelle Reportergene mit destabilisiertem CFP (*CFP**) generiert, bei denen die Promotorregion ausgetauscht werden kann. Hinter der Promotorregion liegt die für Ubiquitin codierende Sequenz (*UBI4*), gefolgt von dem als N-Degron fungierenden Codon für Tyrosin (Y), der Linker Δk , welcher die Effizienz des Degrons moduliert und die für CFP codierende Sequenz (Hackett et al., 2006). Die Halbwertszeit dieser *CFP**-Variante liegt bei 5 min und sie ermöglicht die Messung rapider Veränderungen und Reduktionen der Transkription (Hackett et al., 2006).

Die verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten wurden in der von mir betreuten Bachelorarbeit von Nina Garben an das *CFP** fusioniert und in das Genom von *S. cerevisiae*-Stämmen, in denen *TEC1*, *STE12* oder *TEC1* und *STE12* deletiert waren, integriert (Garben, 2013). Analog zur Bestimmung der *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmenge wurde in diesen Stämmen die *CFP**-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hier zeigte sich, dass die Expression des *P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**-Reportergens in einem *TEC1 STE12*-Stamm relativ schwach war und mit Pheromon leicht zunahm (Abb. 13). Es ist jedoch bekannt, dass es sich bei *TEC1* um ein eher schwach exprimiertes Gen handelt (Ghaemmaghami et al., 2003). Wie bereits für die *TEC1*-Transkripte gezeigt, hatte die Mutation der TCS-Elemente keinen Effekt, da die Expression des *P_{TEC1-ics-PRE}-CFP**-Reportergens vergleichbar zur Expression des *P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**-Reportergens war. In den *S. cerevisiae*-Stämmen mit einem *P_{TEC1-TCS-pre}*- und *P_{TEC1-ics-pre}-CFP**-Reportergen konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden, was nicht ganz mit den gemessenen *TEC1*-Transkriptmengen korreliert (vergleiche Abb. 11 und Abb. 13).

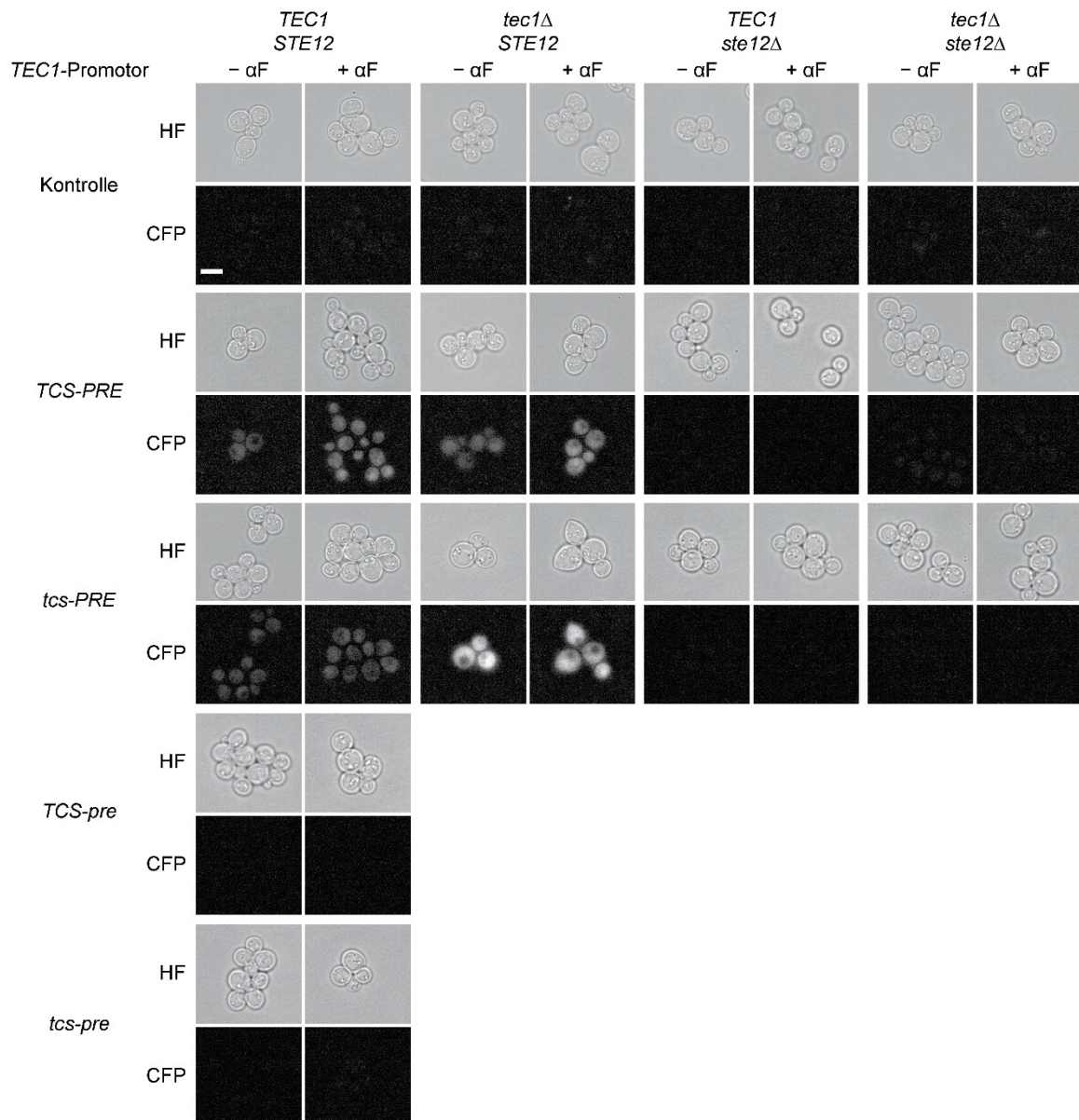


Abb. 13: Ste12 ist wichtig für die Expression eines P_{TEC1} -CFP*-Reportergens.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in LFM-Medium mit 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM1694 (*TEC1 STE12*), YHUM0610 (*tec1Δ STE12*), YHUM1692 (*TEC1 ste12Δ*) und YHUM0639 (*tec1Δ ste12Δ*) als Kontrollen, sowie die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2236 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2237 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-tcs-PRE}-CFP**), YHUM2368 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-pre}-CFP**), YHUM2238 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-tcs-pre}-CFP**), YHUM2239 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2240 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-tcs-PRE}-CFP**), YHUM2241 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2242 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-tcs-PRE}-CFP**), YHUM2243 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**) und YHUM2244 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-tcs-PRE}-CFP**) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten mit Methanol (– αF) oder 1 μM α-Faktor (+ αF) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fluorezenzmikroskopisch im Hellfeld (HF) und unter Verwendung des CFP-Filterwürfels (CFP) untersucht und fotografiert. Die in das Genom der *S. cerevisiae*-Stämme integrierten Reportergene sind wie folgt gekennzeichnet: $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -CFP* = *TCS-PRE*, $P_{TEC1-tcs-PRE}$ -CFP* = *tcs-PRE*, $P_{TEC1-TCS-pre}$ -CFP* = *TCS-pre* und $P_{TEC1-tcs-pre}$ -CFP* = *tcs-pre*. Der Referenzbalken entspricht 5 μm.

In Übereinstimmung mit Köhler et al. (2002) hatte die Deletion des *TEC1*-Gens keinen Einfluss auf die Aktivierung eines $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -CFP*-Reporters. In einem *S. cerevisiae*-Stamm mit einem $P_{TEC1-tcs-PRE}$ -CFP*-Reportergen nahm die Fluoreszenz sogar zu. Waren *STE12*, oder *TEC1* und *STE12* deletiert, konnte weder in einem *S. cerevisiae*-Stamm mit dem $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -

*CFP**-Reportergen, noch in einem Stamm mit dem $P_{TEC1-ics-PRE}$ -*CFP**-Reportergen Fluoreszenz beobachtet werden. Dies stimmt ebenfalls nicht mit den gemessenen *TEC1*-Transkriptmengen überein.

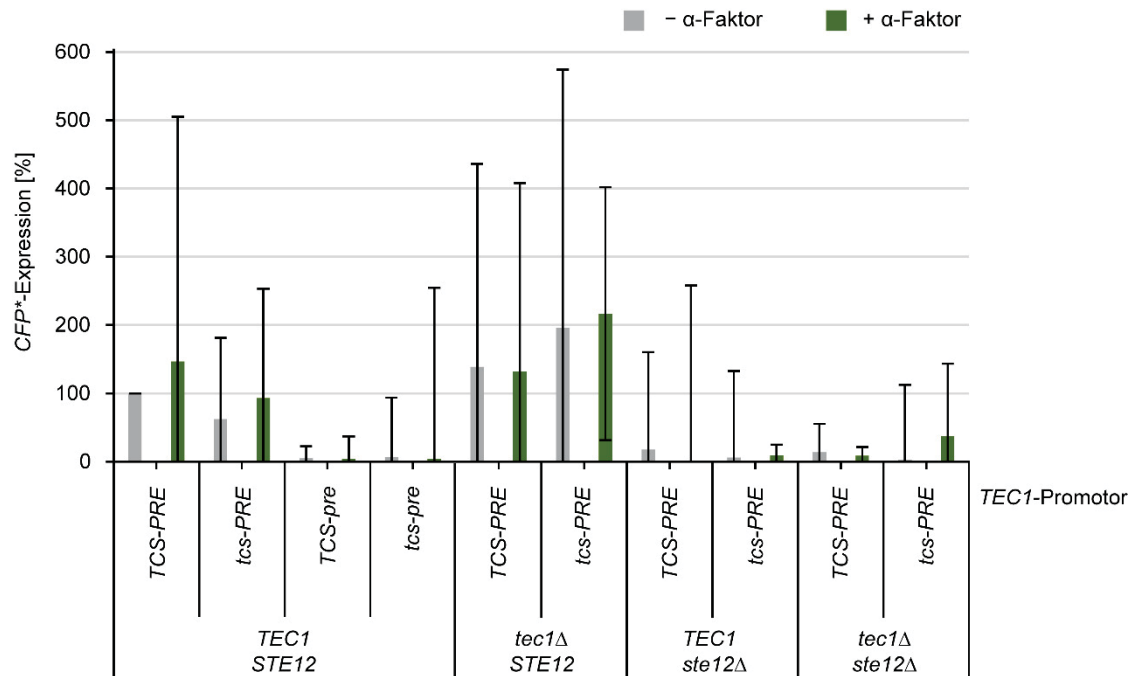


Abb. 14: Quantifizierung der P_{TEC1} -*CFP-Reportergen-Expression unter Konjugationsbedingungen in An- und Abwesenheit von *TEC1* und *STE12*.**

Gezeigt ist die Expressionsstärke der *CFP**-Reportergene in den Stämmen YHUM2236 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2237 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-ics-PRE}-CFP**), YHUM2368 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-pre}-CFP**), YHUM2238 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-ics-pre}-CFP**), YHUM2239 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2240 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-ics-PRE}-CFP**), YHUM2241 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**), YHUM2242 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-ics-PRE}-CFP**), YHUM2243 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**) und YHUM2244 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-ics-PRE}-CFP**) als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**-Kontrollstamm. Für jeden Stamm wurde der Median aus sechs unabhängigen Messungen berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In einem nächsten Schritt wurde die Signalintensität der *CFP**-Fluoreszenz mit dem Programm „ImageJ“ quantifiziert, um die *CFP**-Expression der Reportergene untereinander und mit der durch quantitative Real-Time PCR ermittelten *TEC1*-Expression zu vergleichen. Bei der Quantifizierung zeigte sich, dass die P_{TEC1} -*CFP**-Reportergene sehr schwach exprimiert wurden, da die nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz erhaltenen Werte unter 50 Grauwerten lagen. Die dadurch bedingte hohe Standardabweichung erlaubt deshalb nur bedingt Aussagen über den Einfluss von Pheromon auf die Transkriptionsaktivierung der *CFP**-Reportergene. Jedoch ist auch hier erkennbar, dass die *CFP**-Expression des $P_{TEC1-ics-PRE}$ -*CFP**-Reportergens in einem *S. cerevisiae*-Stamm mit funktionellem *TEC1* und *STE12* vergleichbar mit der Expression des $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -*CFP** im Kontrollstamm zu sein scheint (Abb. 14). Ebenso schien die Aktivierung der $P_{TEC1-TCS-pre}$ - und $P_{TEC1-ics-pre}$ -*CFP**-Reportergene stark reduziert. Die Quantifizierung zeigte ebenfalls, dass die Deletion des *TEC1*-Gens die

Transkriptionsaktivierung eines $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -CFP*-Reportergens nicht beeinflusst. Die Mutation der TCS-Elemente könnte möglicherweise zu einer leichten Zunahme der CFP*-Expression führen und die Deletion von *STE12* und von *TEC1* und *STE12* schien bei beiden CFP*-Reportergenen zu einer stark reduzierten Transkription zu führen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Regulation durch Tec1 über die TCS-Elemente weder unter vegetativen noch Konjugationsbedingungen wichtig für die Expression der P_{TEC1} -CFP*-Reportergene ist, die Regulation durch Ste12 über die PREs hingegen schon. Außerdem zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal der bisher verwendeten CFP*-Reportergene zu schwach war, um die *TEC1*-Regulationsdynamik *in vivo* verlässlich zu untersuchen.

2.1.4.3 Analyse der *TEC1*-Regulationsdynamik auf Einzelzelebene mittels $3 \times mTurquoise 2$ -Reportergenen

Im Rahmen einer in der AG Mösch durchgeführten Bachelorarbeit wurden neue destabilisierte Fluorophore mit einer höheren Signalstärke hergestellt (Schmitz, 2014). Diese zeigten eine deutlich verbesserte Signalintensität im Vergleich zum bisher verwendeten CFP* und schienen deshalb besser geeignet, um die *TEC1*-Regulationsdynamik zu untersuchen. Die verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten wurden an ein destabilisiertes $3 \times mTurquoise 2$ ($3 \times mTurquoise 2^*$) fusioniert und analog zu den P_{TEC1} -CFP*-Reportergenen in das Genom von *S. cerevisiae*-Stämmen integriert, in denen *TEC1*, *STE12* oder beide Gene deletiert waren. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass das $P_{TEC1-TCS-PRE}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ -Reportergen in Anwesenheit von *TEC1* und *STE12* zwar auch relativ schwach exprimiert wurde, die Signalintensität jedoch im Vergleich zum $P_{TEC1-TCS-PRE}$ -CFP* Reportergen deutlich stärker war und in Anwesenheit von α -Faktor leicht zunahm (vergleiche Abb. 13 und Abb. 15). Ebenso war kein Unterschied in der Fluoreszenz zwischen dem Stamm mit einem $P_{TEC1-TCS-PRE}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ - und dem Stamm mit einem $P_{TEC1-TCS-PRE}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ -Reportergen zu erkennen. In den *S. cerevisiae*-Zellen war neben der cytoplasmatischen Fluoreszenz auch eine Akkumulierung des $3 \times mTurquoise 2^*$ im Zellkern zu erkennen. GFP und GFP-Derivate lokalisieren bekanntermaßen nicht nur cytoplasmatisch, sondern können aufgrund ihres geringen Molekulargewichts auch in den Zellkern diffundieren (Seibel et al., 2007).

Das Fluoreszenzsignal des $P_{TEC1-TCS-pre}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ -Reporters war stark reduziert, lag aber im Vergleich mit dem $P_{TEC1-TCS-pre}$ -CFP*-Reportergen dennoch etwas über dem Hintergrund (Abb. 15). Das Fluoreszenzsignal des Stamms mit dem $P_{TEC1-TCS-pre}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ -Reportergen schien sogar etwas stärker zu sein als das des $P_{TEC1-TCS-pre}$ - $3 \times mTurquoise 2^*$ -Reporters.

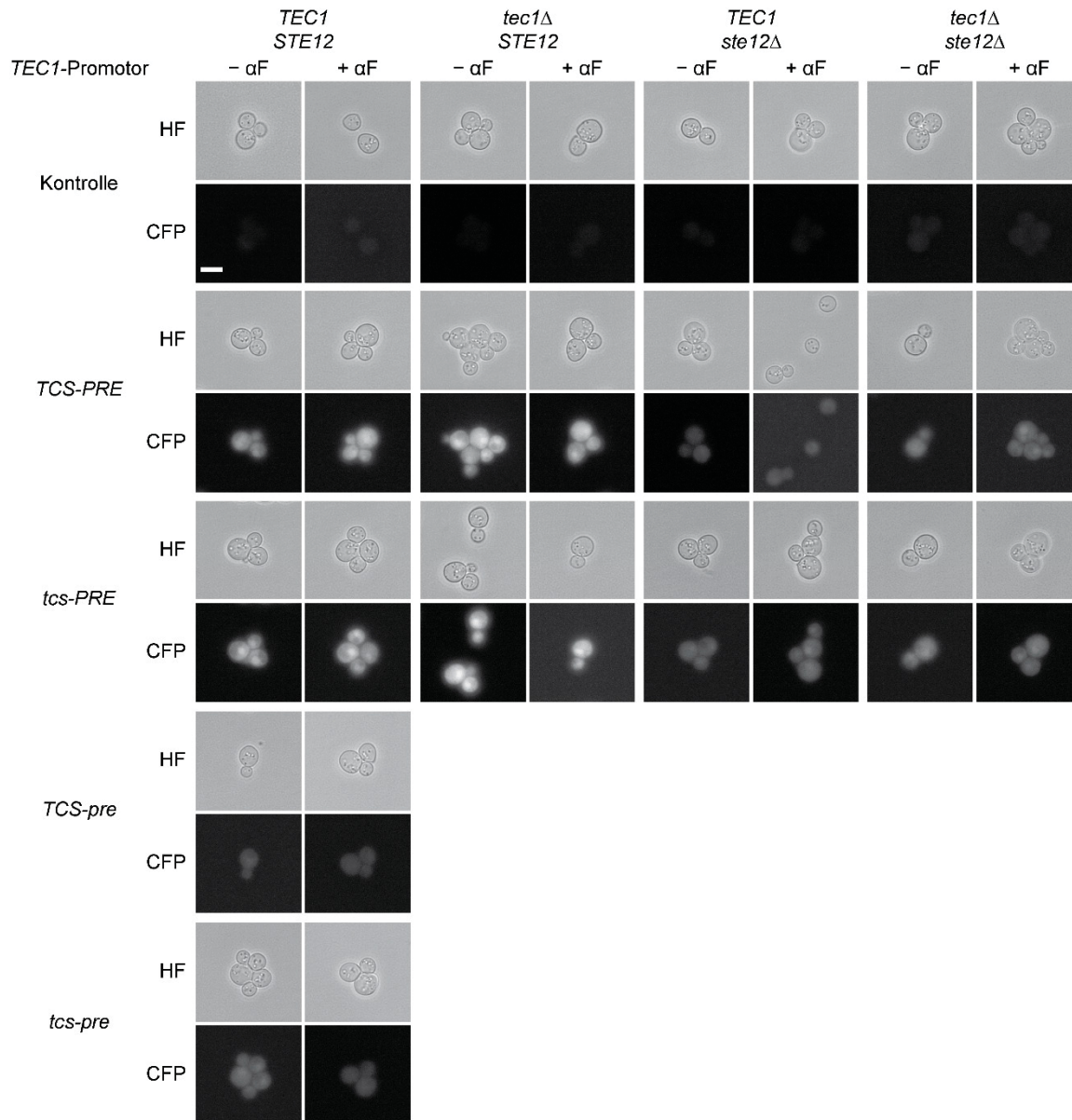


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopie der verschiedenen $P_{TEC1-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergene unter Konjugationsbedingungen in An- und Abwesenheit von *TEC1* und *STE12*.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in LFM-Medium mit 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM1694 (*TEC1 STE12*), YHUM0610 (*tec1Δ STE12*), YHUM1692 (*TEC1 ste12Δ*) und YHUM0639 (*tec1Δ ste12Δ*) als Kontrollen, sowie die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2504/YHUM2505 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2506/YHUM2507 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-tcs-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2508/YHUM2509 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-TCS-pre-3} × mTurquoise 2**), YHUM2510/YHUM2511 (*TEC1 STE12 P_{TEC1-tcs-pre-3} × mTurquoise 2**), YHUM2512/YHUM2513 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2514/YHUM2515 (*tec1Δ STE12 P_{TEC1-tcs-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2516/YHUM2517 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2518/YHUM2519 (*TEC1 ste12Δ P_{TEC1-tcs-PRE-3} × mTurquoise 2**), YHUM2520/YHUM2521 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**) und YHUM2522/YHUM2523 (*tec1Δ ste12Δ P_{TEC1-tcs-PRE-3} × mTurquoise 2**) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten mit Methanol (– αF) oder 1 μM α-Faktor (+ αF) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch im Hellfeld (HF) und unter Verwendung des CFP-Filterwürfels (CFP) untersucht und fotografiert. Die in das Genom der *S. cerevisiae*-Stämme integrierten Reportergene sind wie folgt gekennzeichnet: $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^* = TCS-PRE$, $P_{TEC1-tcs-PRE-3} \times mTurquoise 2^* = tcs-PRE$, $P_{TEC1-TCS-pre-3} \times mTurquoise 2^* = TCS-pre$ und $P_{TEC1-tcs-pre-3} \times mTurquoise 2^* = tcs-pre$. Der Referenzbalken entspricht 5 μm.

Entsprechend den Beobachtungen für das $P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP^*$ -Reportergen hatte die Deletion von *TEC1* keinen Einfluss auf die Expression des $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -

Reportergens. Die Fluoreszenz im *S. cerevisiae*-Stamm mit einem $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Reportergen schien auch hier leicht erhöht zu sein. Waren *STE12*, oder *TEC1* und *STE12* deletiert, war das Fluoreszenzsignal in den Stämmen mit einem $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ - bzw. einem $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Reportergen vergleichbar zum Signal in einem Stamm mit funktionellem *Tec1* und *Ste12* und einem $P_{TEC1-ics-pre-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Reportergen.

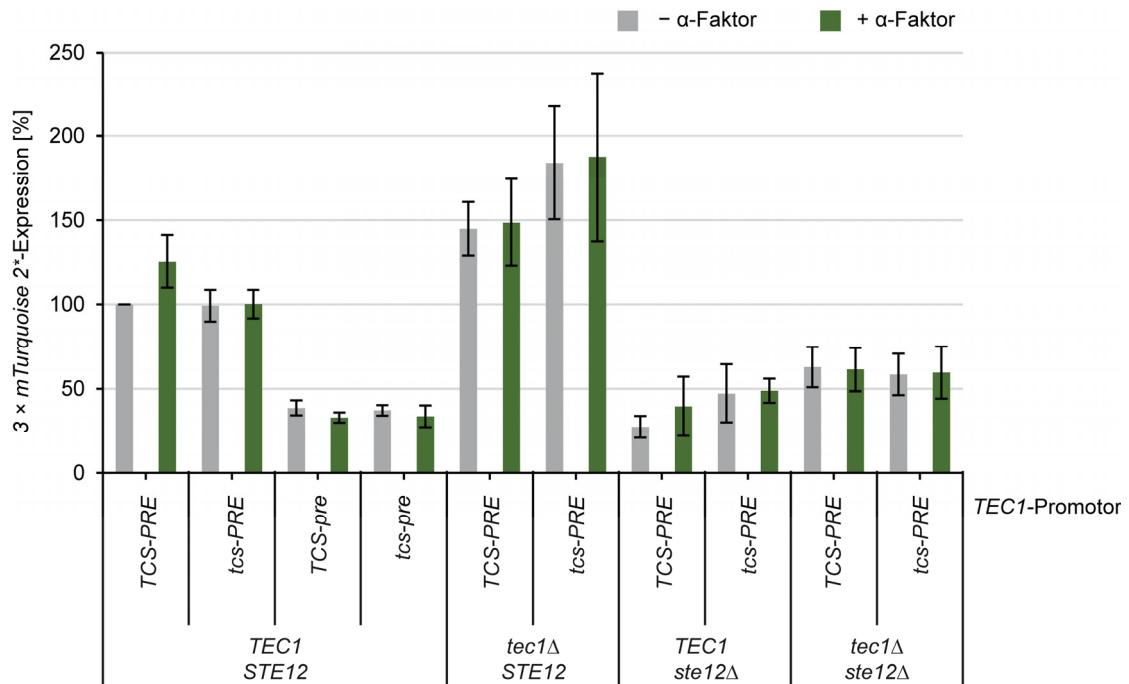


Abb. 16: Quantifizierung der $P_{TEC1-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Reportergen-Expression unter Konjugationsbedingungen in An- und Abwesenheit von *TEC1* und *STE12*.

Gezeigt ist die Expressionsstärke der $3 \times mTurquoise\ 2^*$ -Reportergene in den Stämmen YHUM2504/YHUM2505 (*TEC1 STE12* $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2506/YHUM2507 (*TEC1 STE12* $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2508/YHUM2509 (*TEC1 STE12* $P_{TEC1-TCS-pre-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2510/YHUM2511 (*TEC1 STE12* $P_{TEC1-ics-pre-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2512/YHUM2513 (*tec1Δ STE12* $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2514/YHUM2515 (*tec1Δ STE12* $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2516/YHUM2517 (*TEC1 ste12Δ* $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2518/YHUM2519 (*TEC1 ste12Δ* $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$), YHUM2520/YHUM2521 (*tec1Δ ste12Δ* $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$) und YHUM2522/YHUM2523 (*tec1Δ ste12Δ* $P_{TEC1-ics-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$) als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *TEC1 STE12* $P_{TEC1-TCS-PRE-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Kontrollstamm. Für jeden Stamm wurde der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Unerwartet zeigte die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale, dass die Zugabe von α -Faktor in allen *S. cerevisiae*-Stämmen zu keiner bzw. einer sehr schwachen Induktion der $3 \times mTurquoise\ 2^*$ -Expression führte (Abb. 16). Um ausschließen zu können, dass der α -Faktor die Aktivierung des Konjugationsprogramms nicht mehr induziert, wurde ein „Halo-Assay“ durchgeführt und die Aktivierung eines $P_{FUS1-3 \times mTurquoise\ 2^*}$ -Reportergens mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen (Abb. 17 und Abb. 18).

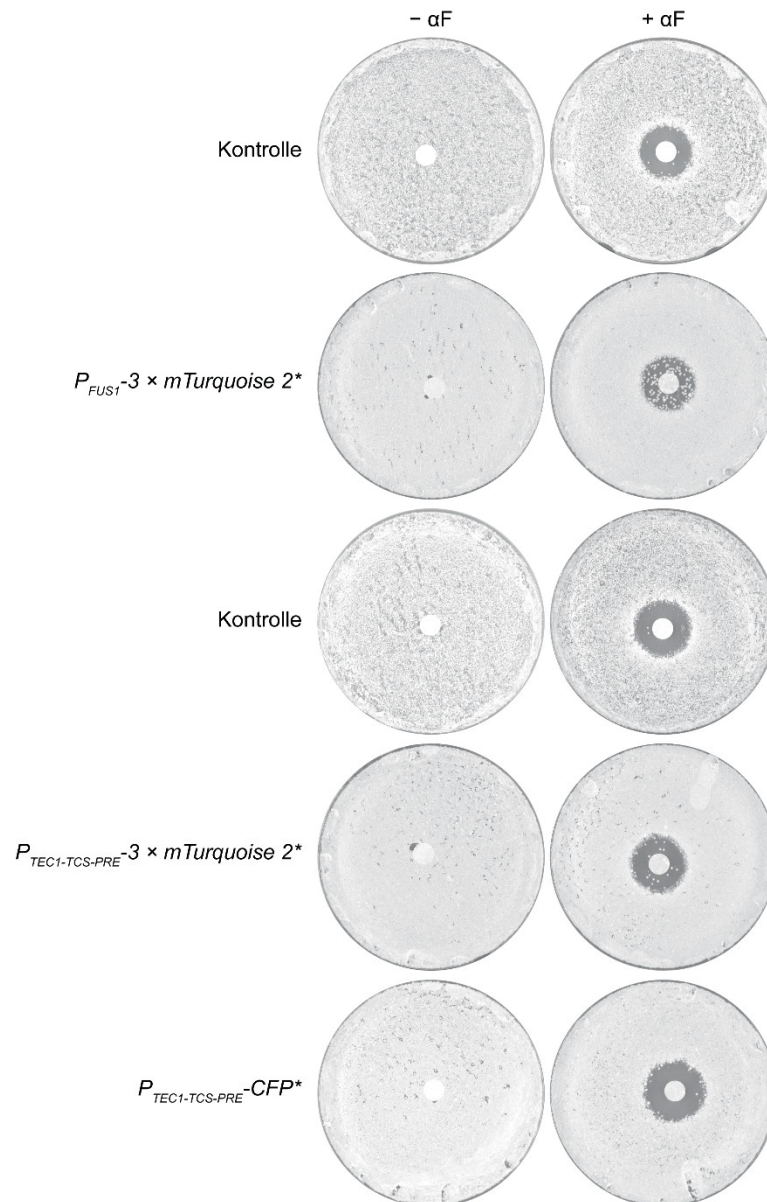


Abb. 17: Pheromon-induzierter Zellzyklusarrest in Stämmen mit $3 \times mTurquoise 2^*$ - und CFP^* -Reportergenen.

Der Pheromon-induzierte Zellzyklusarrest wurde mittels eines Halo-Assays bestimmt. Nach zweistündiger Inkubation in YEPD-Medium wurden je 100 μ l Kultur der Stämme YHUM0909 (Kontrolle, oben), YHUM2483 ($P_{FUSI-3} \times mTurquoise 2^*$), YHUM1694 (Kontrolle, Mitte), YHUM2504/YHUM2505 ($P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$) und YHUM2236 ($P_{TEC1-TCS-PRE-CFP^*}$) auf YEPD-Agar ausplattiert. Auf diese Platten wurde ein mit 10 μ l Methanol ($- \alpha F$) oder α -Faktor ($+ \alpha F$) getränktes Filterpapier platziert und die Bildung des Hemmhofes nach zweitägiger Inkubation fotografiert.

Obwohl für alle Stämme ein Zellzyklusarrest beobachtet werden konnte (Abb. 17), war die Induktion der Expression des $P_{FUSI-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergens vergleichbar zur Induktion des $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergens (Abb. 18). Jedoch konnte bereits eine starke Pheromon-abhängige Induktion der Transkriptionsaktivierung des $P_{FUSI-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reporters beobachtet werden (unveröffentlichte Daten Dr. Sarah Schladebeck).

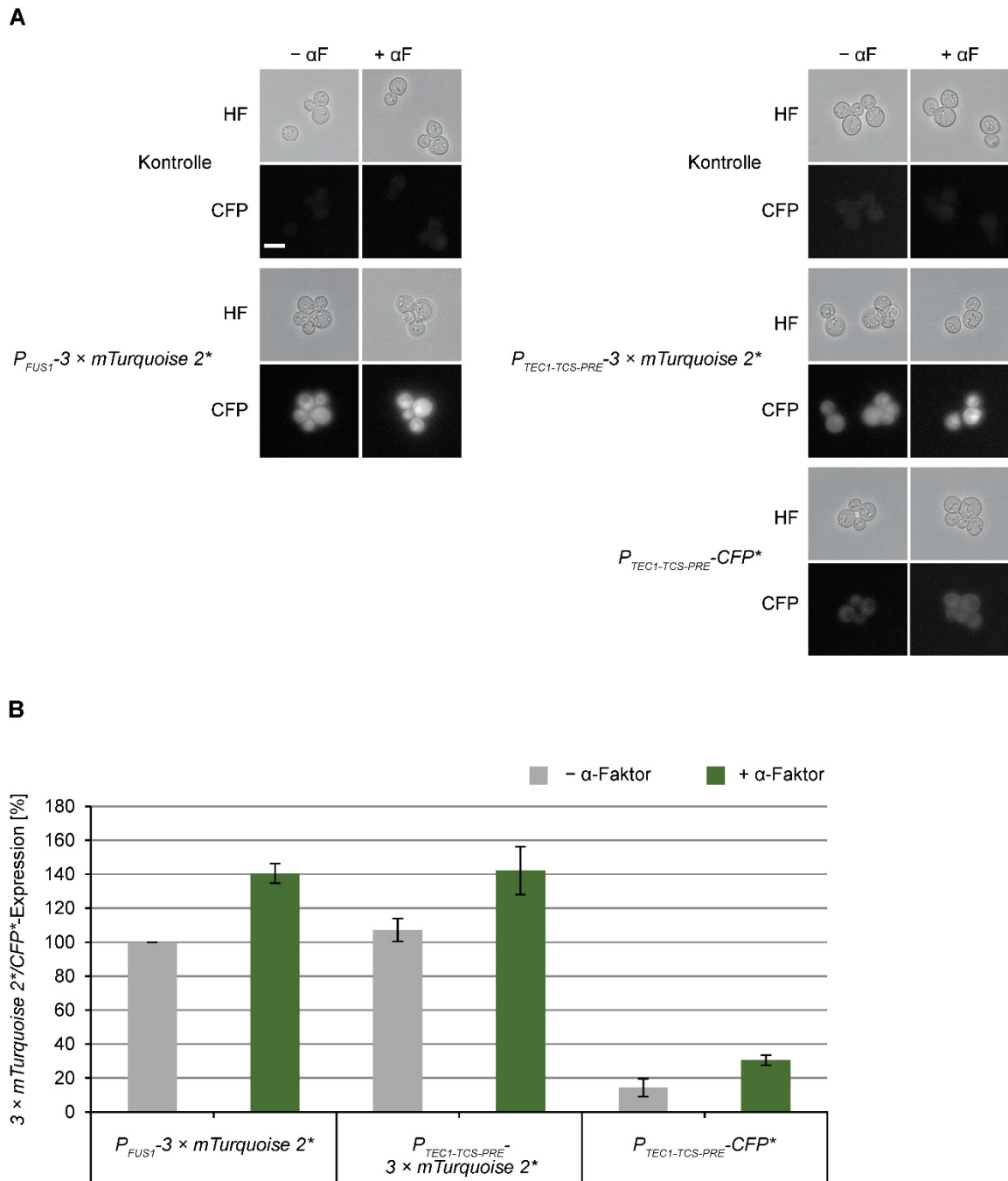


Abb. 18: Aktivierung transkriptioneller Reportergene durch Pheromon.

(A) Fluoreszenzmikroskopie von Stämmen mit transkriptionellen Reportergenen. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in LFM-Medium mit 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0909 und YHUM1694 als Kontrollen, sowie die Stämme YHUM2483 ($P_{FUS1-3} \times mTurquoise 2^*$), YHUM2504/YHUM2505 ($P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$) und YHUM2236 ($P_{TEC1-TCS-PRE-CFP^*}$) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten mit Methanol (– αF) oder 1 μM α-Faktor (+ αF) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch im Hellfeld (HF) und unter Verwendung des CFP-Filterwürfels (CFP) untersucht und fotografiert. Der Referenzbalken entspricht 5 μm. (B) Quantifizierung der Reportergen-Expression unter Konjugationsbedingungen. Gezeigt ist die Expressionsstärke der $3 \times mTurquoise 2^*$ - und CFP^* -Reportergene der unter (A) beschriebenen Stämme als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{FUS1-3} \times mTurquoise 2^*$ -Stamm unter Kontrollbedingungen. Für jeden Stamm wurde der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die $3 \times mTurquoise 2^*$ -Expression des $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ Reporters war vergleichbar zum Kontrollstamm und reduziert in *S. cerevisiae*-Stämmen mit einem $P_{TEC1-TCS-}$

$_{pre-3} \times mTurquoise 2^*$ - bzw. $P_{TEC1-tcs-pre-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergen (Abb. 16). Die Deletion von *TEC1* führte zu einem leichten Anstieg der Transkriptionsaktivierung in einem Stamm mit einem $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reporter und nahezu zu einer Verdopplung des Fluoreszenzsignals, wenn die TCS-Elemente mutiert waren. Die Deletion von *STE12* führte zu einer fast vierfachen Abnahme der Transkriptionsaktivierung des $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergens und einer zweifachen Abnahme der Transkriptionsaktivierung des $P_{TEC1-tcs-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergens (Abb. 16). Die Deletion von *TEC1* und *STE12* führte zu einer 1,6-fachen bzw. einer 1,7-fachen Reduktion der Transkriptionsaktivierung des $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ - bzw. des $P_{TEC1-tcs-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reportergens (Abb. 16). Die für den *ste12Δ* Stamm erhaltenen Intensitäten waren vergleichbar mit der $3 \times mTurquoise 2^*$ Expression des $P_{TEC1-TCS-pre-3} \times mTurquoise 2^*$ - und des $P_{TEC1-tcs-pre-3} \times mTurquoise 2^*$ -Reporters in einem Stamm mit funktionellem *TEC1* und *STE12*. Die erhaltenen Werte für die $3 \times mTurquoise 2^*$ -Expression im *tec1Δ ste12Δ*-Stamm lagen etwas darüber.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass die Regulation der *TEC1*-Expression unter vegetativen und Konjugationsbedingungen über den PRE-vermittelten Regelkreis erfolgt.

2.1.5 Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 unter Glukosemangelbedingungen

Mösch et al. (1999) konnten ein Eingreifen des cAMP/PKA-Signalwegs in die Signalweiterleitung durch das Fus3/Kss1-MAPK Modul demonstrieren und in einer vorangegangenen Abschlussarbeit gewonnene Daten deuten eine potentielle Regulation der *TEC1*-Expression durch Glukose an (Birke, 2005). Deshalb sollte untersucht werden, ob Tec1 durch Glukose reguliert wird und ob der TCS-vermittelte bzw. der PRE-vermittelte Regelkreis für diese Regulation benötigt wird.

Glukosemangel (0,1 % Glukose) führte im $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm zu einer fünffachen Erhöhung der *TEC1*-mRNA-Menge (Abb. 19 A). Diese Zunahme der *TEC1*-Expression konnte ebenfalls in den Mutanten beobachtet werden. So war die mRNA-Menge in einer $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante vierfach erhöht, in der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante sogar zwölfmal und in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante etwa zehnfach.

Übereinstimmend mit der gemessenen *TEC1*-Transkriptmenge war die Tec1-Proteinmenge in dem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm bei Glukosemangel erhöht, im Gegensatz zur mRNA jedoch nur rund zweifach (Abb. 19 B).

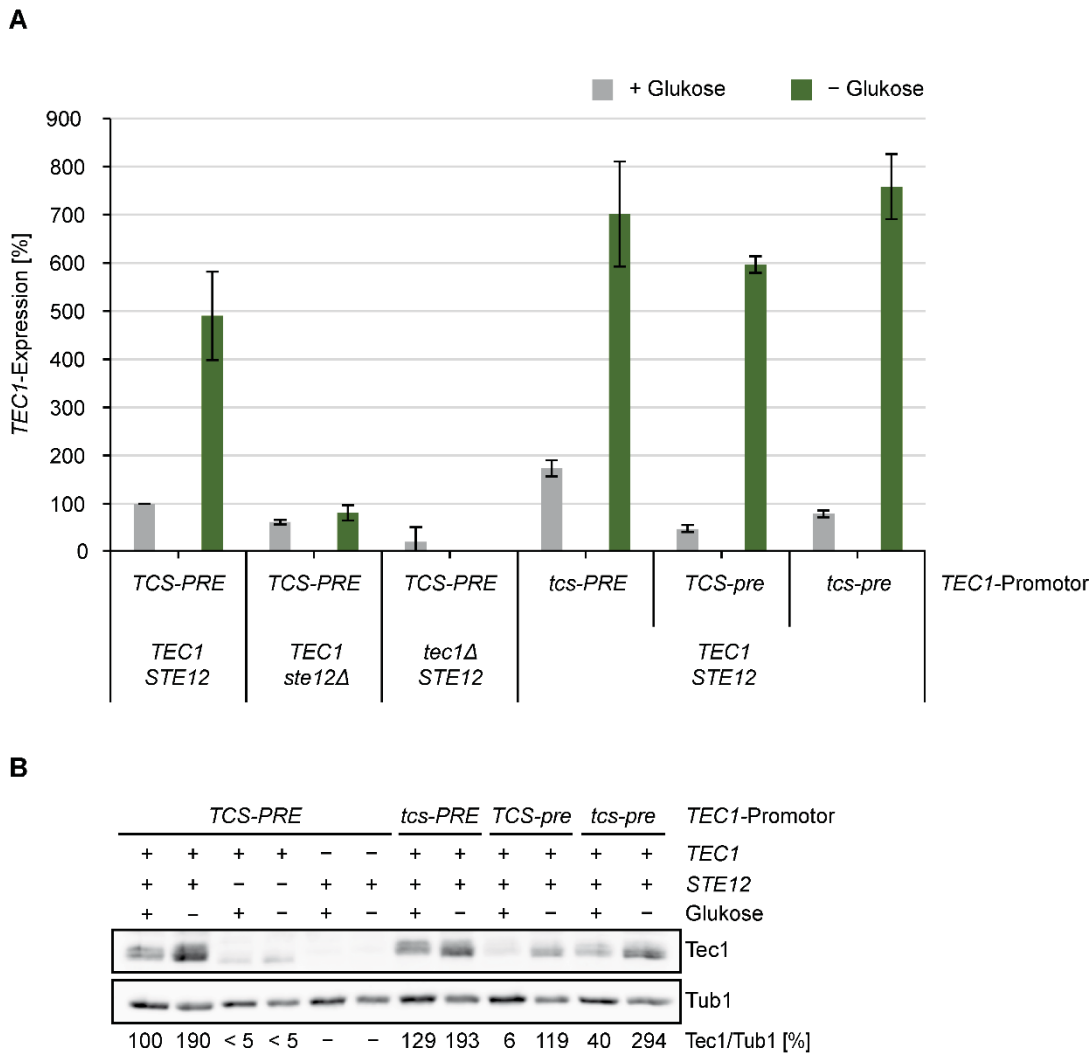


Abb. 19: Die Expression von *TEC1* wird durch Glukosemangel induziert und ist unabhängig von der Bindung von Tec1 und Ste12 an den *TEC1*-Promotor.

(A) Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der *TEC1*-Expression. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 (*P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 (*P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM2421/YHUM2422 (*P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 (*P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 STE12*) aufgeteilt und für weitere 3 h mit 2 % (w/v) (+ Glukose) oder 0,1 % (w/v) (- Glukose) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm an.

Die für die *P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1*-Mutante gemessene Tec1-Proteinmenge war vergleichbar zum Kontrollstamm. In der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Mutante war die Tec1-Proteinmenge bei Glukosemangel 20-fach erhöht und in der *P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1*-Mutante etwa siebenfach. Die unter vegetativen Bedingungen gemessenen Tec1-Proteinmengen korrelierten mit den Transkriptmengen.

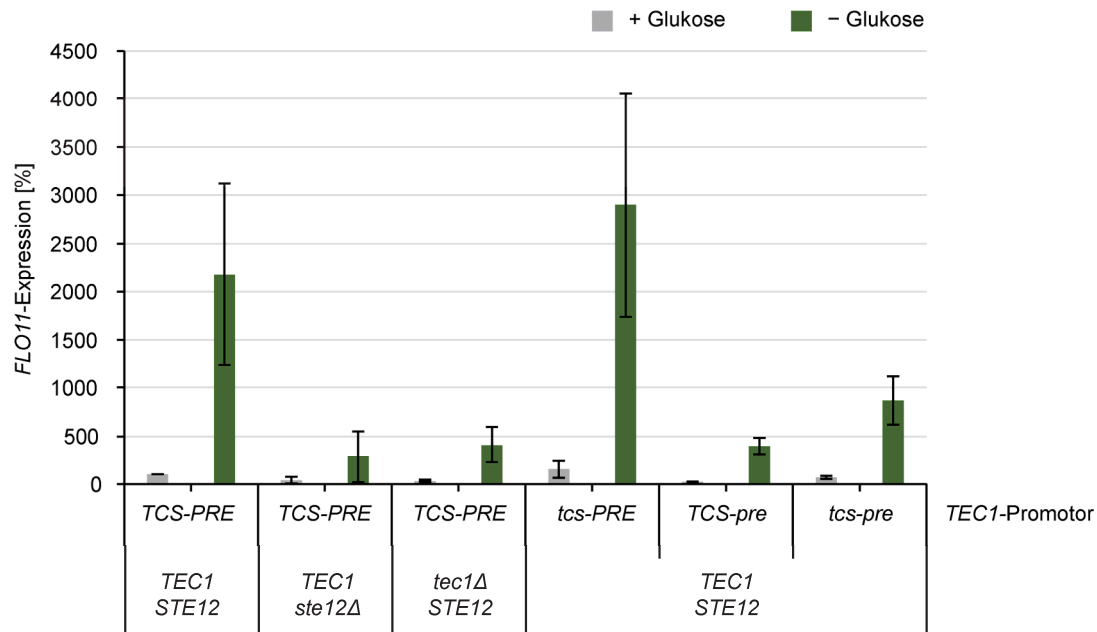


Abb. 20: Die Expression von *FLO11* wird durch Glukosemangel induziert und Tec1 und Ste12 werden für die volle Aktivierung benötigt.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM0680 ($TEC1 ste12\Delta$) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 ($tec1\Delta STE12$), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1 STE12}$) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1 STE12}$) aufgeteilt und für weitere 3 h mit 2 % (w/v) (+ Glukose) oder 0,1 % (w/v) (– Glukose) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Entsprechend der Zunahme von Tec1 war die *FLO11*-mRNA-Menge bei Glukosemangel in dem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm ebenfalls rund 22-fach erhöht (Abb. 20). In früheren Studien konnte bereits eine Induktion der *FLO11*-Expression durch Glukosemangel gezeigt werden (Gagiano et al., 1999; Kuchin et al., 2002). Auch in einer $ste12\Delta$ -Mutante und in einer $tec1\Delta$ -Mutante war die *FLO11*-Transkriptmenge rund sieben- bzw. dreizehnfach erhöht. *FLO11* unterliegt einer komplexen Regulation durch verschiedene Signalkaskaden (Gavrias et al., 1996; Mösch and Fink, 1997; Lo and Dranginis, 1998; Rupp et al., 1999; Halme et al., 2004; Brückner and Mösch, 2012) und es ist wahrscheinlich, dass die Kontrolle der *FLO11*-Expression in der $ste12\Delta$ - bzw. der $tec1\Delta$ -Mutante Tec1-unabhängig über den cAMP/PKA-Signalweg und den Snf1/Glukose-Repressionsweg erfolgt. In der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ - und der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante war die *FLO11*-Transkriptmenge bei Glukosemangel rund 20-fach erhöht und in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante zwölfmal.

Zusammenfassend waren sowohl Tec1 als auch Flo11 sehr stark durch Glukosemangel reguliert. Im Fall von *TEC1* ist die Induktion der Expression zwar unabhängig von den TCS-Elementen und PREs, jedoch scheint Ste12 trotzdem in die Regulation involviert zu sein. Die Transkription von *FLO11* hingegen wurde in allen Stämmen durch Glukosemangel induziert.

Waren die PREs im *TEC1*-Promotor mutiert, war die Transkriptionsaktivierung allerdings schwächer.

2.1.6 Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 unter Stickstoffmangelbedingungen

Frühere Arbeiten haben eine Regulation von Tec1 durch Stickstoffmangel gezeigt (Birke, 2005; Brückner, 2007; Brückner et al., 2011). Da diese Regulation vermutlich unabhängig vom TOR-Komplex 1 erfolgt (Brückner et al., 2011), sollte die Untersuchung der Rolle der TCS-Elemente und PREs im *TEC1*-Promotor unter Stickstoffmangelbedingungen näheren Aufschluss darüber geben, wie diese Regulation erfolgt.

Stickstoffmangel führte sowohl im $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm, als auch in der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -, der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante zu einer 1,6-fachen Zunahme und in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante zu einer 3-fachen Zunahme der *TEC1*-mRNA (Abb. 21 A). Für den *ste12Δ*-Stamm konnte bei Stickstoffmangel kein Effekt beobachtet werden.

Bei der Bestimmung der Tec1-Proteinmengen zeigte sich unter Stickstoffmangel ein genau gegenteiliges Bild (Abb. 21 B). So war die Tec1-Proteinmenge bei Stickstoffmangel im $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm und der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante um die Hälfte und in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante 2,6-fach reduziert. Im *ste12Δ*-Stamm und der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante konnte eine noch stärkere Reduktion der Tec1-Proteinmenge bei Stickstoffmangel beobachtet werden. Dies steht in Widerspruch zu der bereits demonstrierten 2,7-fachen Zunahme der Tec1-Proteinmenge unter Stickstoffmangel (Brückner et al., 2011). Möglicherweise spielte der Zeitraum, über den der Stickstoffmangel erfolgt, eine Rolle. Die erhöhten Tec1-Proteinmengen wurden in Brückner et al. nach 70 Minuten gemessen, wohingegen die reduzierte Proteinmenge in dieser Arbeit nach 3 h bestimmt wurde.

Aufgrund der hohen Standardabweichung kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob Stickstoffmangel gegebenenfalls einen Einfluss auf die *FLO11*-Expression hat (Abb. 22). Auch hier ist die *FLO11*-Expression des $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamms und der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante vergleichbar, wohingegen sie in der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ - und der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante reduziert war. Die *FLO11*-Expression lag in der $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante auch hier leicht über der Expression in der $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante.

Da *FLO11* in diploiden *S. cerevisiae*-Zellen für das Stickstoffmangel-induzierte pseudohyphale Wachstum wichtig ist, sollte in einem nächsten Schritt die Pseudohyphenbildung in diploiden Stämmen mit den verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten untersucht werden.

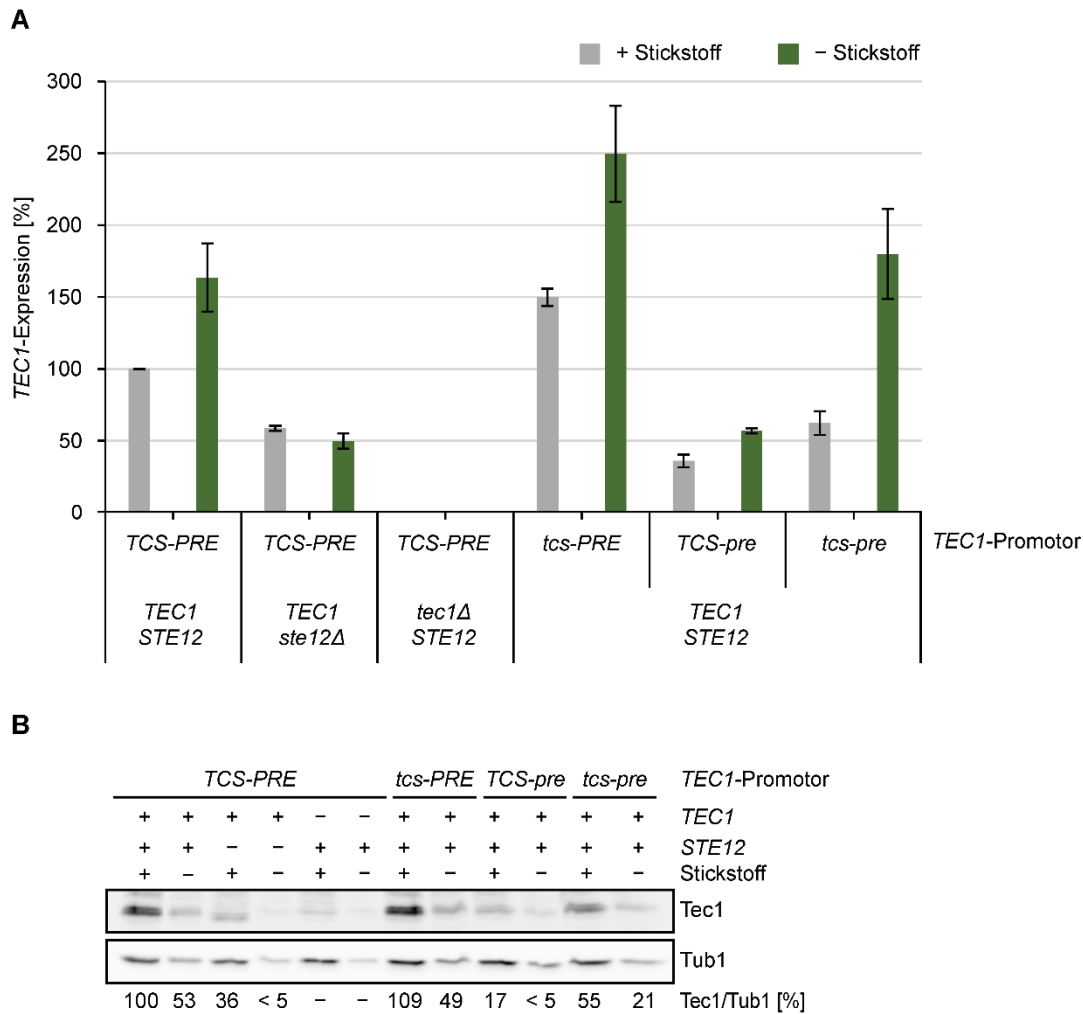


Abb. 21: Die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen werden unabhängig von der Bindung von Tec1 und Ste12 an den *TEC1*-Promotor antagonistisch durch Stickstoffmangel reguliert.

(A) Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der *TEC1*-Expression. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 (*P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 (*P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM2421/YHUM2422 (*P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 (*P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 STE12*) aufgeteilt und für weitere 3 h mit Ammoniumsulfat (+ Stickstoff) oder ohne Ammoniumsulfat (- Stickstoff) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm an.

Um diploide *P_{TEC1}*-Mutanten zu generieren, wurde zunächst in den haploiden Mutanten ein Geschlechtstypwechsel induziert (vgl. Kapitel 5.10.4). Anschließend wurden die *MAT α* -Ausgangsstämme mit den *MAT α* -Stämmen gekreuzt und die entstandenen diploiden *P_{TEC1}*-Mutanten für die weitere Analyse verwendet.

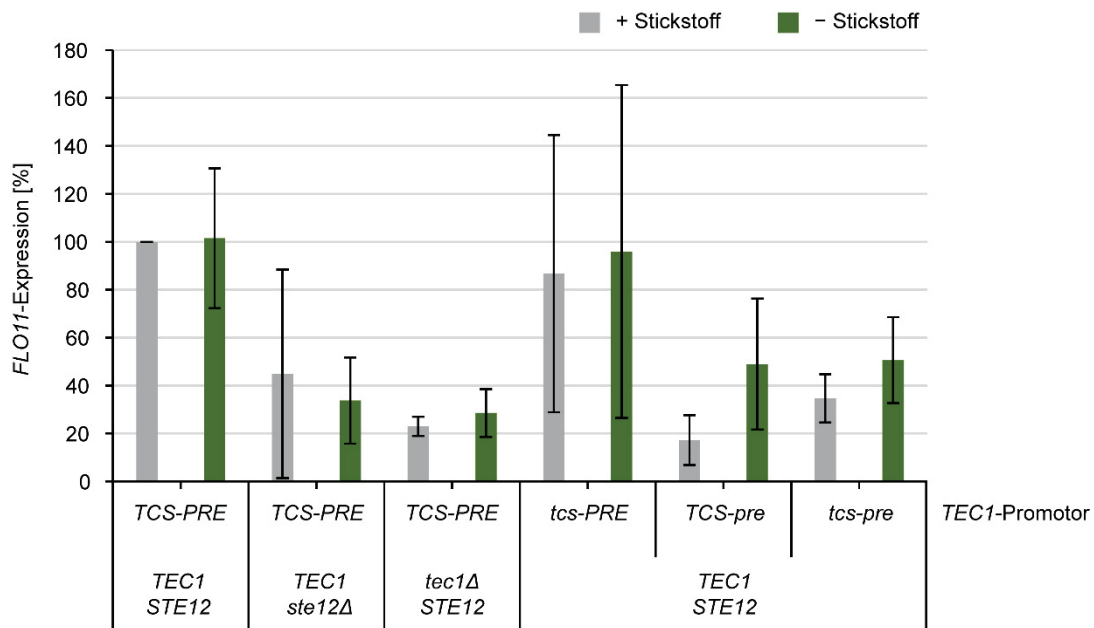


Abb. 22: Einfluss von Stickstoffmangel auf die Expression von *FLO11*.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM0680 ($TEC1 ste12\Delta$) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1 STE12}$), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1 STE12}$) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1 STE12}$) aufgeteilt und für weitere 3 h mit Ammoniumsulfat (+ Stickstoff) oder ohne Ammoniumsulfat (– Stickstoff) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen und die *FLO11*-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Zunächst wurden dann die Tec1-Proteinmengen in den diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen unter nährstoffreichen Bedingungen bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob die Mutation der PREs und TCS-Elemente in diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen einen zu den haploiden Mutanten vergleichbaren Effekt auf die Tec1-Proteinmenge hat. Es konnte auch hier eine vergleichbare Menge an Tec1-Protein im homozygot diploiden $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm und der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante beobachtet werden (Abb. 23 A). Im *flo11Δ*-Stamm lag sie mit 148 % etwas höher als im $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm und der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante. Waren die PREs im *TEC1*-Promotor mutiert, konnte auch in einem homozygot diploiden Stamm eine Reduktion der Tec1-Proteinmenge auf 59 % beobachtet werden. Somit war ungefähr dreimal mehr Tec1-Protein in einem homozygot diploiden $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Stamm vorhanden als in einem haploiden, da die Proteinmenge in der haploiden Mutante im Schnitt bei rund 20 % lag. In der homozygot diploiden $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante konnte mit 123 % etwa 2,5-fach mehr Tec1, als in einer haploiden Mutante (rund 50 %) nachgewiesen werden. Die Tec1-Proteinmenge war auch zwischen dem heterozygot diploiden $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Kontrollstamm und der $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}$ -Mutante vergleichbar (Abb. 23 B). In der heterozygot diploiden $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Mutante lag die Tec1-Proteinmenge mit 77 % etwas

höher als in der homozygoten $P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1$ -Mutante, welche 59 % Tec1-Protein enthielt. Die Tec1-Proteinmenge in der heterozygot diploiden $P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1$ -Mutante war mit 95 % im Vergleich zur homozygot diploiden $P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1$ -Mutante leicht reduziert (Abb. 23).

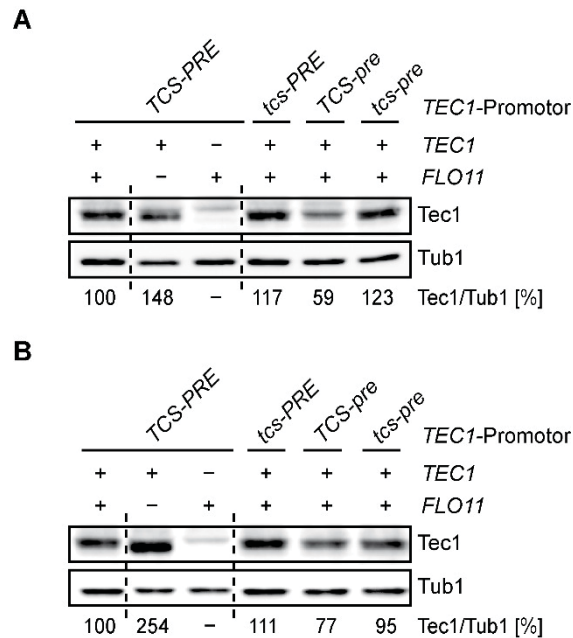


Abb. 23: Bestimmung der Tec1-Proteinmengen in diploiden P_{TEC1} -Mutanten.

(A) Bestimmung der Tec1-Proteinmengen in homozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen. Die homozygot diploiden Stämme YHUM2463/YHUM2464 ($P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 FLO11$), YHUM0963 ($P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 flo11\Delta$), YHUM2471/YHUM2472 ($tec1\Delta FLO11$), YHUM2465/YHUM2466 ($P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 FLO11$), YHUM2467/YHUM2468 ($P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 FLO11$) und YHUM2469/YHUM2470 ($P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 FLO11$) mit dem Leerplasmid B2445 (*URA3*) wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium angezogen und anschließend Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem $P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 FLO11$ -Kontrollstamm an. (B) Bestimmung der Tec1-Proteinmengen in heterozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen. Die heterozygot diploiden Stämme YHUM2381/YHUM2382 ($P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 FLO11$), YHUM0963 ($P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 flo11\Delta$), YHUM2377/YHUM2378 ($tec1\Delta FLO11$), YHUM2383/YHUM2384 ($P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 FLO11$), YHUM2385/YHUM2386 ($P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 FLO11$) und YHUM2387/YHUM2388 ($P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 FLO11$) mit dem Leerplasmid B2445 (*URA3*) wurden wie in (A) beschrieben angezogen und die Tec1-Proteinmenge bestimmt.

Erwartungsgemäß konnte sowohl in einem homozygoten als auch in einem heterozygoten $P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1$ -Kontrollstamm unter Nährstoffmangel die Ausbildung von Pseudohyphen beobachtet werden und in einem $flo11\Delta$ - oder einem $tec1\Delta$ -Stamm nicht (Abb. 24). Die Überexpression von *TEC1* hatte in einem $flo11\Delta$ -Stamm keinen Einfluss, wohingegen in einem $tec1\Delta$ -Stamm Pseudohyphen ausgebildet wurden. Waren die TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor mutiert, konnte weder im homozygoten, noch im heterozygoten Stamm ein Unterschied zum Kontrollstamm beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnten homozygote und heterozygote Stämme, in denen die PREs oder die TCS-Elemente und PREs im *TEC1*-Promotor mutiert waren, keine Pseudohyphen mehr formen.

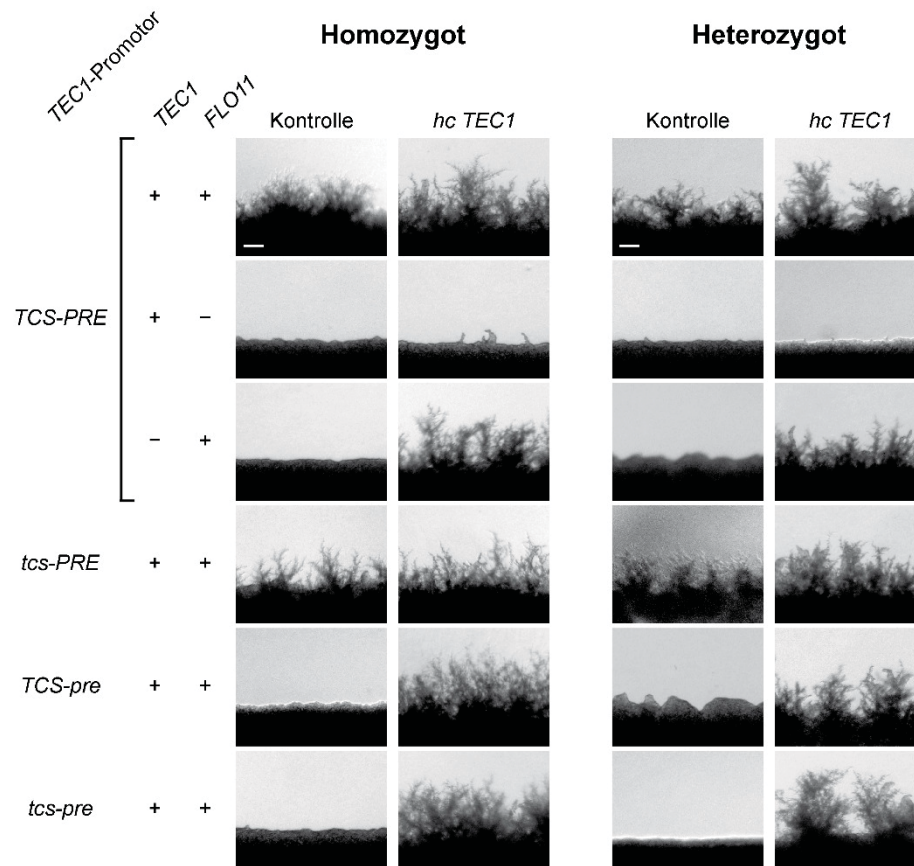


Abb. 24: Die PRE-vermittelte Kontrolle der *TEC1*-Expression ist wichtig für die Biofilmbildung.

(A) Untersuchung der Flo11-abhängigen Pseudohyphenbildung in homozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen. Die homozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2463/YHUM2464 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 FLO11}$), YHUM0963 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 flo11\Delta}$), YHUM2471/YHUM2472 ($tec1\Delta FLO11$), YHUM2465/YHUM2466 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1 FLO11}$), YHUM2467/YHUM2468 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1 FLO11}$) und YHUM2469/YHUM2470 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1 FLO11}$) mit dem Leerplasmid B2445 (*URA3*, Kontrolle) und BHUM0030 (*hc TEC1*) wurden für fünf Tage auf SLAD-Agar angezogen und die Ausbildung von Pseudohyphen fotografisch dokumentiert. (B) Untersuchung der Flo11-abhängigen Pseudohyphenbildung in heterozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen. Die heterozygot diploiden *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2381/YHUM2382 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 FLO11}$), YHUM0963 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1 flo11\Delta}$), YHUM2377/YHUM2378 ($tec1\Delta FLO11$), YHUM2383/YHUM2384 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1 FLO11}$), YHUM2385/YHUM2386 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1 FLO11}$) und YHUM2387/YHUM2388 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1 FLO11}$) mit dem Leerplasmid B2445 (*URA3*, Kontrolle) und BHUM0030 (*hc TEC1*) wurden wie in (A) beschrieben angezogen. Der Referenzbalken entspricht 100 μ m.

Die Beobachtung, dass die $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante kein pseudohyphales Wachstum zeigt, steht in starkem Kontrast zu der gemessenen Tec1-Proteinmenge, die vergleichbar mit dem Kontrollstamm war. Die Tec1-Proteinmengen wurden jedoch unter nährstoffreichen Bedingungen gemessen, wohingegen die Pseudohyphenbildung unter Nährstoffmangel untersucht wurde. Auch in den homozygoten und heterozygoten $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ - und $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Mutante führte die Überexpression von *TEC1* zur Ausbildung von Pseudohyphen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmangel zu einer Zunahme der *TEC1*-mRNA und einer Abnahme der Tec1-Proteinmenge führt. Zudem waren Stämme, in denen die PREs oder die TCS-Elemente und PREs mutiert waren, nicht mehr in der Lage Pseudohyphen auszubilden.

2.1.7 Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 unter Aminosäuremangelbedingungen

Aminosäuremangel aktiviert die Expression von *FLO11* und induziert so das adhäsive Wachstum in haploiden und diploiden *S. cerevisiae*-Zellen. Hierfür scheinen Tec1 und Ste12 in diploiden Stämmen wahrscheinlich nicht wichtig zu sein (Braus et al., 2003).

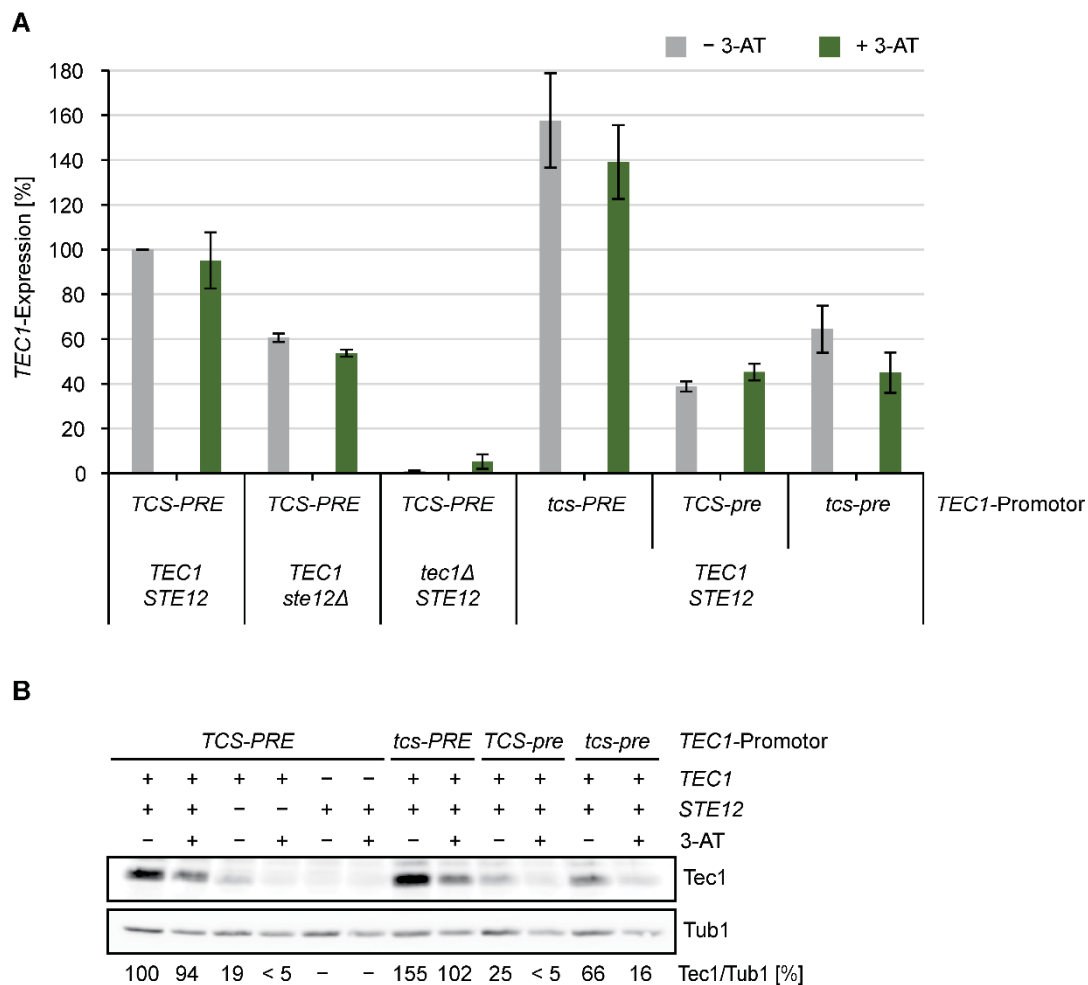


Abb. 25: Die Tec1-Proteinmenge wird negativ durch 3-AT beeinflusst.

(A) Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der *TEC1*-Expression. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 (*P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 (*P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM2421/YHUM2422 (*P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 (*P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 STE12*) aufgeteilt und für weitere 3 h ohne (– 3-AT) oder mit 10 mM 3-AT (+ 3-AT) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm an.

Um zu untersuchen, ob Aminosäuremangel möglicherweise die *TEC1*-Expression beeinflusst und die *FLO11*-Expression in haploiden Zellen ebenfalls Tec1- und Ste12-unabhängig kontrolliert, wurden die Stämme mit den verschiedenen *P_{TEC1}*-Varianten in An- und Abwesenheit von 3-Aminotriazol (3-AT) angezogen. Bei 3-AT handelt es sich um ein Histidin-Analogon, welches die Imidazol-Glycerinphosphat-Dehydratase kompetitiv inhibiert (Hilton et al., 1965; Klopotoski and Wiater, 1965).

Die Zugabe von 3-AT hatte weder im *P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}*-Kontrollstamm, noch in der *P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}*-, der *P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}*- oder der *P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}*-Mutante einen Effekt auf die Expression von *TEC1* (Abb. 25 A).

Während die Tec1-Proteinmenge im Kontrollstamm unverändert blieb, konnte eine leichte Reduktion der Tec1-Proteinmenge in den Stämmen mit den verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten beobachtet werden (Abb. 25 B). In der *P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}*-Mutante war die Proteinmenge 1,5-fach reduziert, in der *P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}*-Mutante rund zwölfmal und in der *P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}*-Mutante vierfach. Auch in der *ste12Δ*-Mutante konnte eine Abnahme der Tec1-Proteinmenge beobachtet werden. Zusammenfassend scheint 3-AT Tec1 nur auf der Proteinebene zu beeinflussen. Aufgrund einer sehr hohen Standardabweichung kann über die *FLO11*-Expression keine verlässliche Aussage getroffen werden (Daten nicht gezeigt).

2.1.8 Regulation der *TEC1*-Expression durch Tec1 und Ste12 bei osmotischem Stress

In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss von osmotischem Stress auf die Regulation von Tec1 untersucht werden. Wie in Abb. 26 A zu sehen ist, hatte der durch Zugabe von NaCl ausgelöste osmotische Stress weder einen Effekt auf die *TEC1*-Expression im *P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}*-Kontrollstamm, noch auf die Expression in der *P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1}*-, der *P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}*- oder der *P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}*-Mutante.

Auch die Tec1-Proteinmengen wurden durch die Zugabe von NaCl nicht beeinflusst (Abb. 26 B). Diese Beobachtung stützt frühere Analysen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von 1 M KCl weder die *TEC1*-Expression noch die Proteinmengen verändert (Davenport et al., 1999; Shock et al., 2009).

Wie erwartet, konnte für *FLO11* eine 2,4-fache Induktion der Expression im *P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}*-Kontrollstamm unter osmotischem Stress beobachtet werden (Abb. 27) (Jansen et al., 2001).

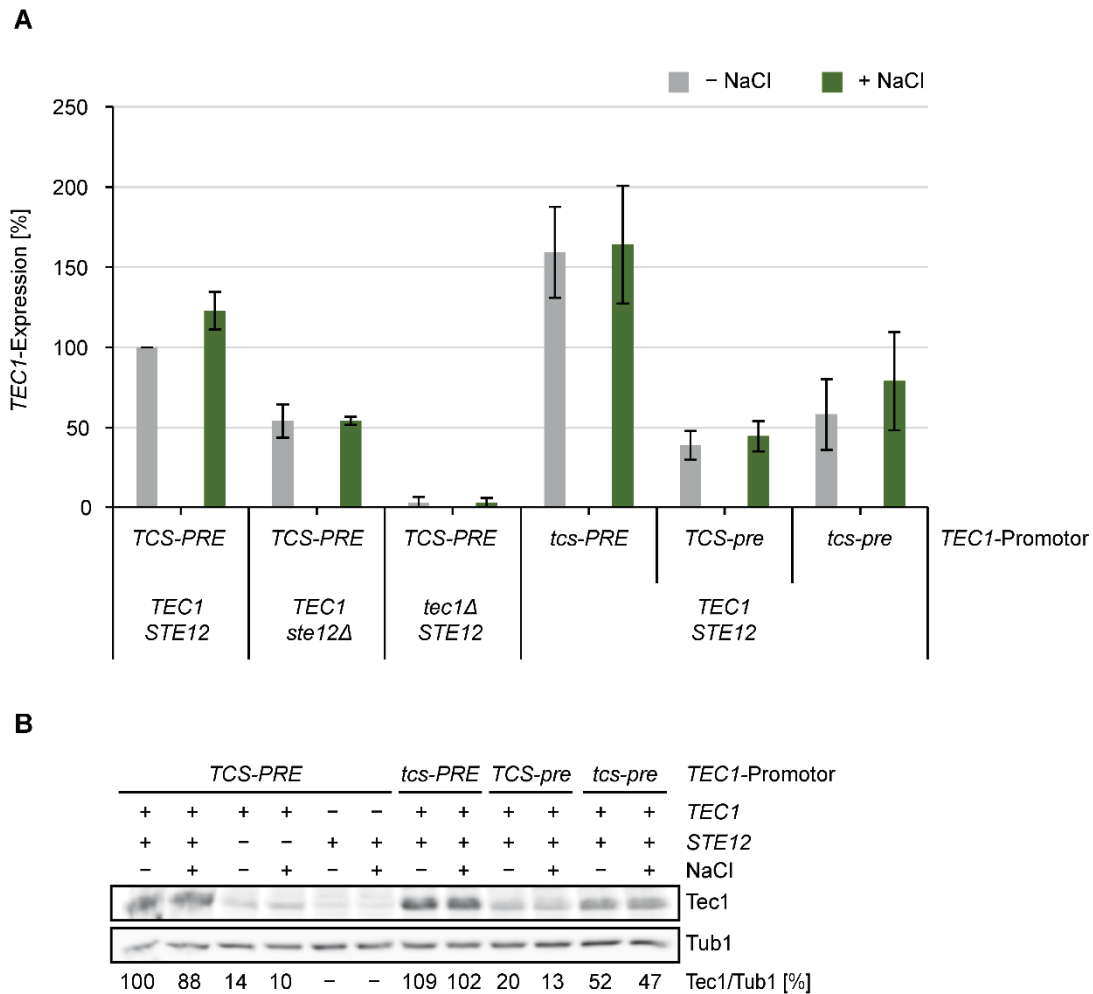


Abb. 26: Die *TEC1*-Expression wird nicht durch NaCl beeinflusst.

(A) Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der *TEC1*-Expression. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 (*P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 (*P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1 STE12*), YHUM2421/YHUM2422 (*P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 STE12*) und YHUM2423/YHUM2424 (*P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 STE12*) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten ohne (– NaCl) oder mit 0,1 M NaCl (+ NaCl) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm an.

Auch in der *ste12Δ*- und der *tec1Δ*-Mutante konnte eine zwei- beziehungsweise dreifache Induktion der *FLO11*-Expression beobachtet werden. In der *P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1*-Mutante nahm die *FLO11*-mRNA unter osmotischem Stress um den Faktor 2,6 und in der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Mutante um den Faktor 2,2 zu. Inwieweit die Expression in der *P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1*-Mutante beeinflusst wird, ist unklar. Zum einen war die Standardabweichung zu hoch, um eine klare Aussage treffen zu können, und zum anderen war die Expression von *FLO11* unter Kontrollbedingungen ungewöhnlich hoch.

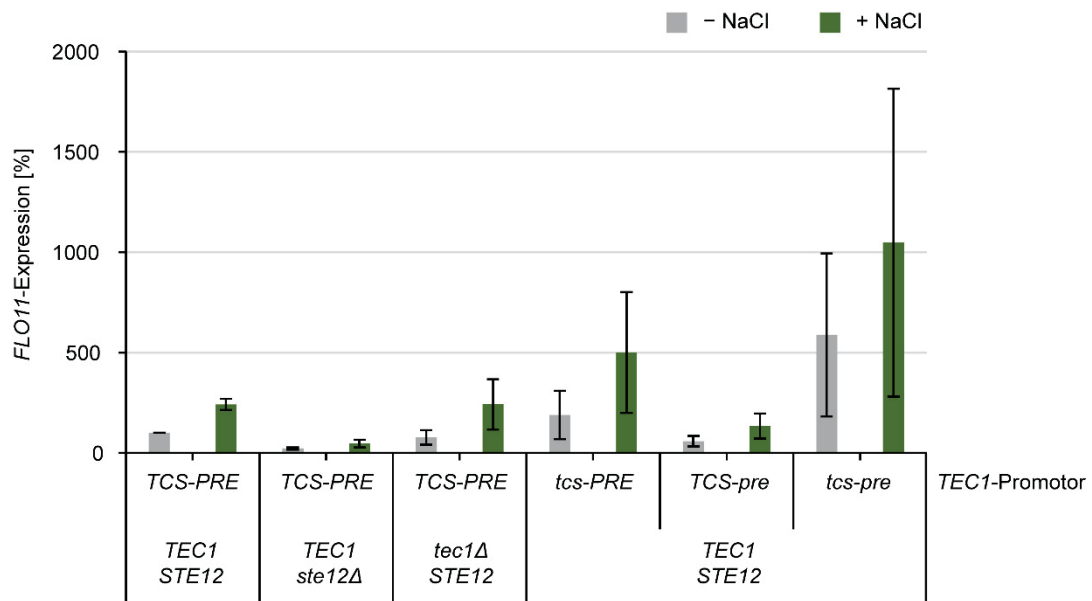


Abb. 27: Einfluss von NaCl auf die Expression von *FLO11*.

Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil wurden die Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme YHUM2417/YHUM2418 ($P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 STE12$), YHUM0680 (*TEC1 ste12Δ*) mit den Leerplasmiden B2439 (*LEU2*) und B2797 (*HIS3*), YHUM2415/YHUM2416 (*tec1Δ STE12*), YHUM2419/YHUM2420 ($P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1 STE12$), YHUM2421/YHUM2422 ($P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1 STE12$) und YHUM2423/YHUM2424 ($P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1 STE12$) aufgeteilt und für weitere 90 Minuten ohne (– NaCl) oder mit 0,1 M NaCl (+ NaCl) inkubiert. Anschließend wurden Proben für die Isolierung von RNA entnommen und die *FLO11*-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. Die Expressionsstärke ist als Prozentsatz relativ zur Expression in einem $P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1$ -Kontrollstamm angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Tec1 weder auf der transkriptionellen, noch auf der posttranskriptionellen Ebene durch osmotischen Stress beeinflusst wurde und die Induktion der *FLO11*-Expression Tec1-unabhängig erfolgt.

2.2 Translationelle Regulation der *TEC1*-Expression

Neben der transkriptionellen Regulation von Tec1 durch sich selbst und Ste12, sowie der Kontrolle der Tec1-Stabilität durch Ste12, wird Tec1 auch auf der translationellen Ebene und durch posttranslationale Modifikationen reguliert (vergleiche Kapitel 1.4, Einleitung). In einer von mir betreuten Bachelorarbeit wurde untersucht, wie die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen durch die An- bzw. Abwesenheit der MAPKK Ste7 beeinflusst werden und welche Rolle dabei eine C-terminale Markierung mit YFP spielt (Fries, 2012). In einem *ste7Δ*-Stamm können die beiden MAPK Fus3 und Kss1 nicht mehr aktiviert werden. Dadurch bleibt Ste12 ebenfalls inaktiv und es ist keine effiziente *TEC1*-Expression mehr möglich. Jedoch konnte ich im Rahmen meiner Masterarbeit zeigen, dass die Tec1-YFP Menge in einem *ste7Δ* Stamm höher war, als in einem Stamm mit funktionellem *STE7* (Weisser, 2011).

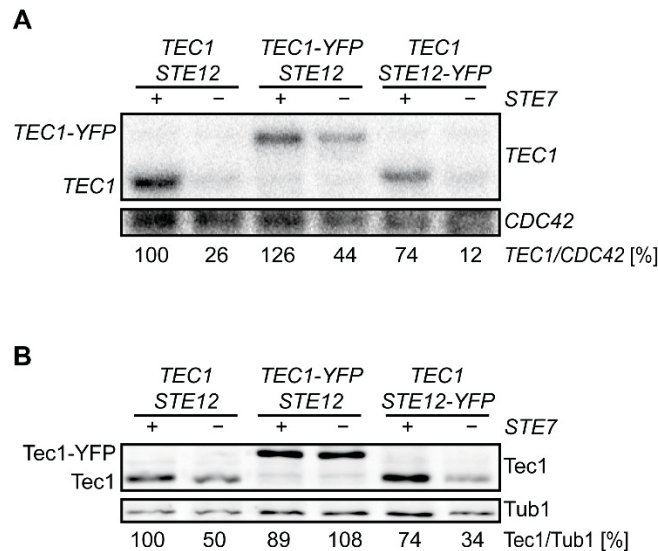


Abb. 28: Einfluss einer C-terminalen YFP-Markierung auf die translationelle Regulation von *TEC1*.

(A) Northern-Analyse zur Überprüfung des Einflusses einer C-terminalen YFP-Markierung auf die *TEC1*-Transkriptmenge. Die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0271 (*TEC1 STE12 STE7*), YHUM1107 (*TEC1 STE12 ste7Δ*), YHUM1950 (*TEC1-YFP STE12 STE7*), YHUM2199 (*TEC1-YFP STE12 ste7Δ*), YHUM1951 (*TEC1 STE12-YFP STE7*) und YHUM1953 (*TEC1 STE12-YFP ste7Δ*) wurden in YNB-Medium mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil bis zum Erreichen der logarithmischen Phase angezogen und anschließend Proben für die RNA-Extraktion entnommen. Die *TEC1*-Transkriptmengen wurden mittels quantitativer Northern-Analyse mit radioaktiv markierten *TEC1*- und *CDC42*-DNA-Sonden in zwei unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die *TEC1*-Transkriptmenge als Prozentsatz relativ zur *TEC1*-Transkriptmenge in einem *TEC1 STE12 STE7*-Kontrollstamm an. Die Abbildung stammt aus Fries, 2012. (B) Western-Analyse zur Überprüfung des Einflusses einer C-terminalen YFP-Markierung auf die Tec1-Proteinmenge. Für die Western-Analyse wurden aus den unter (A) beschriebenen Kulturen Proben für die Proteinextraktion entnommen. Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in zwei unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *TEC1 STE12 STE7*-Kontrollstamm an. Die Abbildung stammt aus Fries, 2012.

Da bereits bekannt ist, dass die Menge des Tec1-Proteins auf der translationellen Ebene negativ durch das RNA-Bindeprotein Mpt5 beeinflusst wird (Prinz et al., 2007), wäre ein Verlust dieses Regulationsmechanismus durch die C-terminale YFP-Markierung denkbar. Um dies näher zu untersuchen, wurden die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen in Stämmen mit und ohne C-terminaler YFP-Markierung in An- und Abwesenheit von *STE7* bestimmt und miteinander verglichen (Abb. 28). War *STE7* deletiert, konnte in allen Stämmen eine von der C-terminalen YFP-Markierung unabhängige starke Abnahme der *TEC1*-Transkripte beobachtet werden (Abb. 28 A). Auch die Tec1-Proteinmenge nahm in Abwesenheit von *STE7* in einem *TEC1 STE12*-Stamm und einem *TEC1 STE12-YFP*-Stamm deutlich ab (Abb. 28 B). Im Gegensatz zu den Transkriptmengen nahm die Tec1-Proteinmenge in Abwesenheit von *STE7* nicht ab, wenn Tec1 am C-Terminus mit YFP markiert war. Hier waren die gemessenen Proteinmengen in einem *ste7Δ*- und einem *STE7*-Stamm vergleichbar. Somit scheint die C-terminale YFP-Markierung von Tec1 zu einem Verlust der Regulation durch Mpt5 zu führen.

2.3 Synthetische Regulation der *TEC1*-Expression

2.3.1 Die Kontrolle des *rtTA* über den Promotor des humanen Cytomegalievirus (*P_{CMV}*) ermöglicht nur eine schwache Expression von *TEC1*

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation der *TEC1*-Expression sollen in Zukunft für die Erstellung eines quantitativen Modells des Fus3/Kss1-MAPK Moduls genutzt werden. Dieses Modell kann dann im Weiteren dazu verwendet werden, synthetische Module zu generieren. Als erste Vorarbeit hierzu war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine gezielte Regulation der *TEC1*-Expression durch das Ersetzen eines PREs durch ein synthetisches Promotorelement zu ermöglichen.

Für die synthetische Regulation der *TEC1*-Expression sollte das Tetrazyklin-regulierte System benutzt werden, da es Nährstoff-unabhängig ist und zelluläre Prozesse nicht beeinflusst (Wishart et al., 2005). Um eine synthetische Regulation zu erreichen, wurde ein synthetischer *TEC1*-Promotor generiert, in welchem die PREs mutiert sind und eine einzelne Operatorsequenz (tetO₁, 19 bp) für den reversen Tetrazyklin-regulierten Transaktivator (rtTA) in das PRE an Position –153 bis –159 eingebracht wurde. Auch dieser synthetische Promotor wurde dazu genutzt, um ein Plasmid zu konstruieren, in dem das *TEC1*-Gen unter Kontrolle dieses Promotors ist (vergleiche Tab. 9). Anschließend wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm generiert, in welchem *TEC1* unter Kontrolle des *TEC1-TCS-pre-tetO₁*-Promotors ist und der rtTA eingebracht wurde. Die Expression des *rtTA* wird durch den Promotor des humanen Cytomegalievirus (*P_{CMV}*) kontrolliert. Initiale Messungen der Tec1-Proteinmengen sowie der Adhäsionsfähigkeit dieses Stamms in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin wurden mit einem *rtTA*, welcher von einem CEN-Plasmid exprimiert wurde, durchgeführt (Abb. 29). Für die Untersuchungen wurde das Tetrazyklin-Analogon Doxyzyklin verwendet. Es weist eine höhere Effizienz als Tetrazyklin und andere Analoga auf und es konnte gezeigt werden, dass es in niedrigen Dosen nicht toxisch für *S. cerevisiae* ist (Garí et al., 1997).

Wie in Abb. 29 A zu sehen ist, war Tec1 nach 4 h mit Doxyzyklin in einem *P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}*-Kontrollstamm vorhanden. In der Probe ohne Doxyzyklin wurde eine vergleichbare Menge an Tec1-Protein gemessen. Erwartungsgemäß, war die Tec1-Proteinmenge in der *tec1Δ*- und der *P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}*-Mutante stark reduziert. Im *P_{TEC1-TCS-pre-tetO₁-TEC1}*-Stamm konnte nach vierstündiger Inkubation mit Doxyzyklin eine Zunahme der Tec1-Proteinmenge um 19 % beobachtet werden, welche jedoch vergleichbar zu der Proteinmenge in der Probe ohne Doxyzyklin war. Die Tec1-Proteinmenge war erst nach 24 h Inkubation mit Doxyzyklin rund 140-fach erhöht (Abb. 29 B).

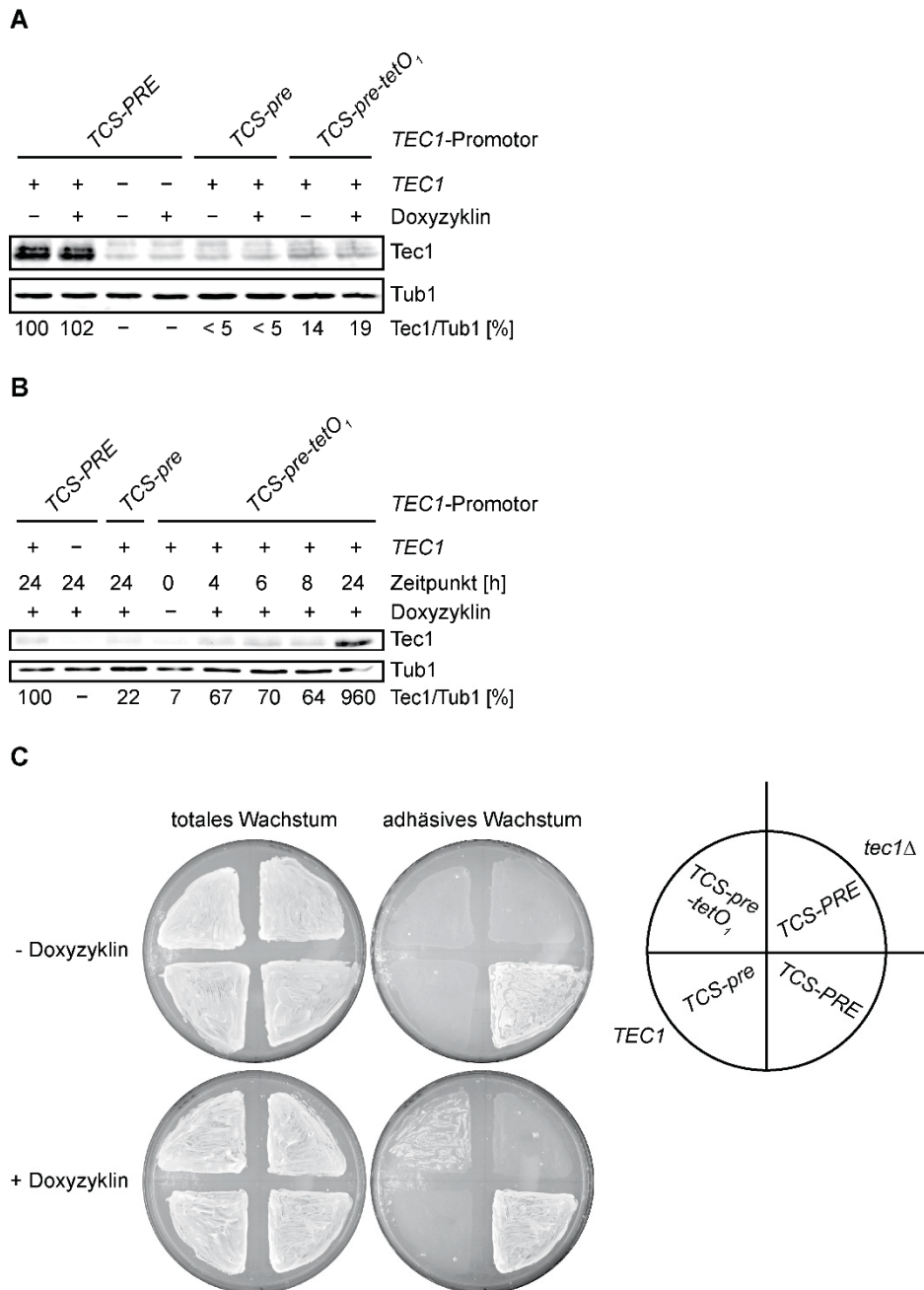


Abb. 29: Vergleich der CEN-basierten *P_{CMV}-rtTA*-vermittelten, Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten.

(A) Western-Analyse zur Bestimmung der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression zum Zeitpunkt 4 h. (B) Western-Analyse zur Bestimmung der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression über 24 h. Nach dreistündiger Inkubation in SC-Medium mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin und 0,2 mM Uracil wurde von den *S. cerevisiae*-Stämmen YHUM2201 (*P_{TEC1}-TCS-PRE-TEC1*), YHUM0610 (*tec1Δ*), YHUM2203 (*P_{TEC1}-TCS-pre-TEC1*) und YHUM2233 (*P_{TEC1}-TCS-pre-tetO₁-TEC1*), welche das Plasmid BHUM1815 (*P_{CMV}-rtTA*) trugen, zunächst für den Zeitpunkt 0 h eine Probe für die Proteinextraktion entnommen (nicht für alle Stämme gezeigt). Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und für weitere 8 h ohne (– Doxyzyklin) oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) inkubiert. Es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die Proteinextraktion entnommen (nicht für alle Stämme gezeigt). Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1}-TCS-PRE-TEC1* *P_{CMV}-rtTA*-Kontrollstamm an. (C) Bestimmung der Flo11-abhängigen Adhäsion an Agar mittels Waschtest. Um das adhäsive Wachstum zu bestimmen, wurden die unter (A) genannten Stämme für fünf Tage auf SC-Tryptophan-Agar ohne (– Doxyzyklin) und mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) angezogen und die Platten vor (totales Wachstum) und nach der Entfernung nicht-adhäsiver Zellen (adhäsives Wachstum) fotografiert.

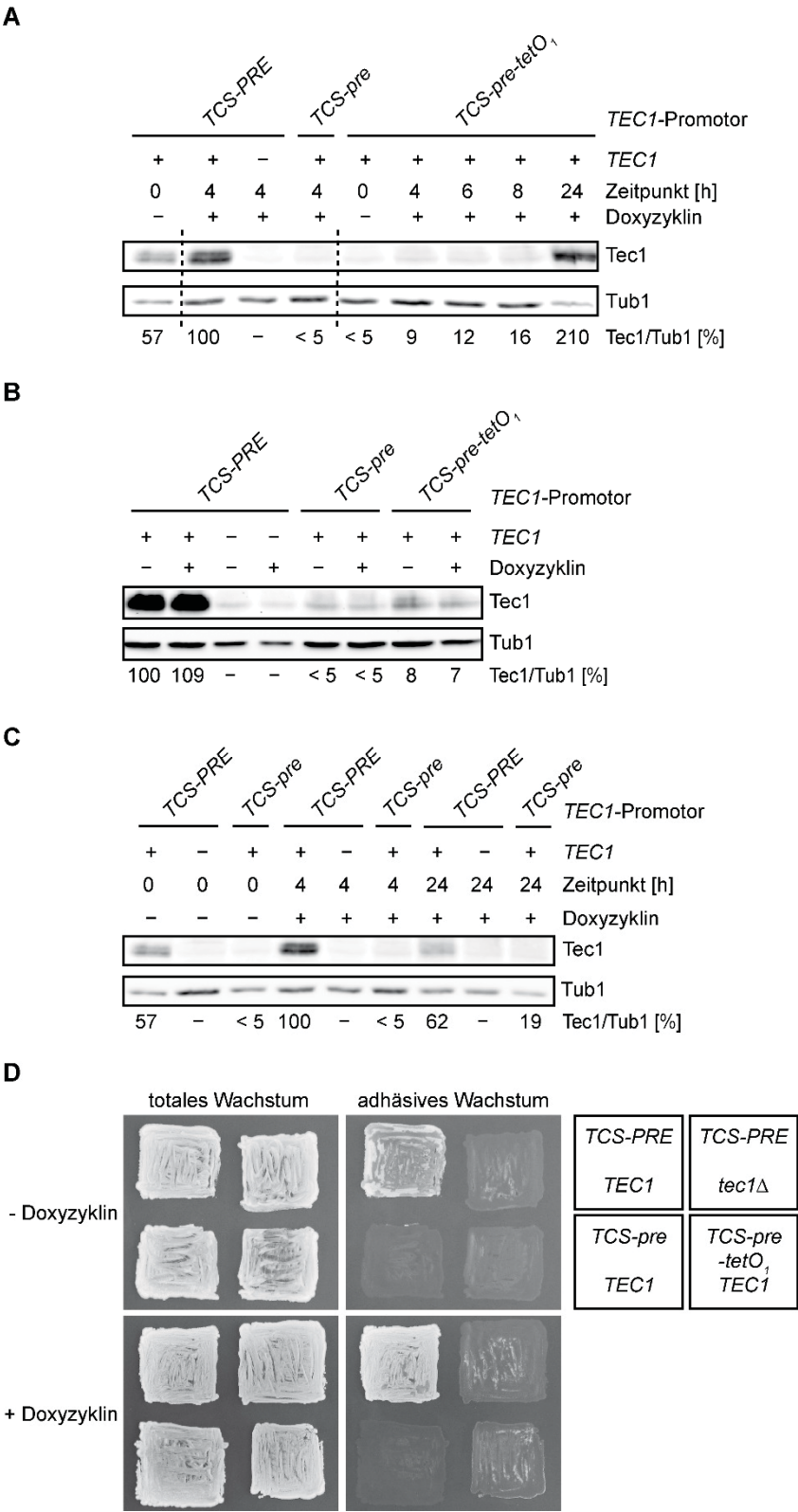


Abb. 30: *P_{CMV}-rtTA*-vermittelte, Doxyzyklin-abhängige *TEC1*-Expression in einem *S. cerevisiae*-Stamm mit einer einzelnen tet-Operatorsequenz im *TEC1*-Promotor.
Nach dreistündiger Inkubation in SC-Medium mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin und 0,2 mM Uracil wurde von den *S. cerevisiae*-Stämmen YHUM2429/YHUM2430 (*P_{TEC1}-TCS-PRE-TEC1 P_{CMV}-rtTA*), YHUM2425/YHUM2426 (*tec1Δ P_{CMV}-rtTA*), YHUM2431/YHUM2432 (*P_{TEC1}-TCS-pre-TEC1 P_{CMV}-rtTA*) und YHUM2433/YHUM2434 (*P_{TEC1}-TCS-pre-tetO₁-TEC1 P_{CMV}-rtTA*) zunächst für den Zeitpunkt 0 h eine Probe für die Proteinextraktion entnommen. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und für weitere 8 h ohne (– Doxyzyklin) oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) inkubiert. (Fortsetzung am Ende der nächsten Seite).

Wie erwartet, zeigte der *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Doxyzyklin eine starke Adhäsion, wohingegen der *tec1Δ*- und der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Stamm eine stark reduzierte Adhäsion aufwiesen (Abb. 29 C). Der *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamm zeigte in Abwesenheit von Doxyzyklin ebenfalls eine stark reduzierte Adhäsion und in Anwesenheit von Doxyzyklin eine schwache Adhäsion.

Um eine stabile Vererbung des *rtTA* zu gewährleisten, wurden die Messungen unter Verwendung eines genomisch integrierten *rtTA* wiederholt. Die Western-Analyse in Abb. 30 A zeigt, dass in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1* Kontrollstamm nach 4 h mit Doxyzyklin Tec1 vorhanden war und auch in der Probe ohne Doxyzyklin wurde eine vergleichbare Menge an Tec1-Protein gemessen (Abb. 30 B). Da in der Probe zum Zeitpunkt 0 h rund 40 % weniger Protein gemessen wurde, wurden alle Werte auf die Tec1-Proteinmenge zum Zeitpunkt 4 h im Kontrollstamm normiert (Abb. 30). Die niedrigere Proteinmenge könnte damit erklärt werden, dass die *TEC1*-Expression, oder die Tec1-Proteinstabilität, im Laufe der verschiedenen Wachstumsphasen variiert. So konnte eine etwa 40 %ige Reduktion der Tec1-Proteinmenge zwischen den Zeitpunkten 4 h und 24 h gemessen werden (Abb. 30 C). Die Tec1 Proteinmenge war in der *tec1Δ*- und in der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Mutante wie erwartet auf unter 5 % reduziert (Abb. 30 A). Im *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamm konnte nach 4 h eine sehr schwache Zunahme auf 9 % beobachtet werden, die jedoch innerhalb von acht Stunden nicht signifikant zunahm. Erst nach 24 h konnte eine rund 200-fach erhöhte Tec1-Proteinmenge gemessen werden (Abb. 30 A).

Wie erwartet, zeigte der *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Doxyzyklin eine starke Adhäsion, wohingegen der *tec1Δ*- und der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Stamm eine stark reduzierte Adhäsion aufwiesen (Abb. 30 D). Die Adhäsionsfähigkeit des *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamms war in Abwesenheit von Doxyzyklin ebenfalls drastisch reduziert und auch in Anwesenheit von Doxyzyklin konnte keine Adhäsion beobachtet werden.

Abb. 30 (Fortsetzung): Es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die Proteinextraktion entnommen (nicht für alle Stämme gezeigt). Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1 P_{CMV-rtTA}*-Kontrollstamm an. (A) Western-Analyse zur Bestimmung der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression über 24 h. (B) Vergleich der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression zum Zeitpunkt 4 h. (C) Vergleich der *TEC1*-Expression in Anwesenheit von Doxyzyklin in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Stamm, einem *tec1Δ*-Stamm und einem *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Stamm zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h und 24 h. (D) Bestimmung der Flo11-abhängigen Adhäsion an Agar mittels Waschtest. Um das adhäsive Wachstum zu bestimmen, wurden die unter (A) genannten Stämme für fünf Tage auf YEPD-Agar ohne (– Doxyzyklin) und mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) angezogen und die Platten vor (totales Wachstum) und nach der Entfernung nicht-adhäsiver Zellen (adhäsives Wachstum) fotografiert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die *TEC1*-Expression und daraus resultierend auch die Adhäsionsfähigkeit, in einem *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamm durch die Zugabe von Doxyzyklin nicht signifikant induziert werden kann. Dies könnte zum einen daran liegen, dass eine einzelne Bindestelle für den rtTA nicht ausreichend ist oder die Position der Bindestelle nicht optimal ist. Zum anderen wäre es denkbar, dass der *rtTA* möglicherweise nur sehr schwach exprimiert wird, da er unter Kontrolle eines viralen Promotors steht, dessen Aktivität in Hefe zu schwach sein könnte.

2.3.2 Die Kontrolle des *rtTA* über den *STE12*-Promotor ermöglicht eine optimale Expression von *TEC1*

Um zu überprüfen, ob die Aktivität des *CMV*-Promotors in Hefe zu schwach ist, sollte der *rtTA* von einem Hefepromotor exprimiert werden. Hierbei fiel die Wahl auf den *STE12*-Promotor, da die Menge an rtTA in diesem Fall vergleichbar mit der Menge an Ste12 sein sollte, welches die *TEC1*-Expression in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm aktiviert.

Auch in einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm mit einem *P_{STE12-rtTA}* war nach 4 h mit Doxyzyklin eine ausreichende Menge an Tec1-Protein vorhanden und in etwa vergleichbar zur Tec1-Menge in Abwesenheit von Doxyzyklin (Abb. 31 A und B). Die Tec1-Proteinmenge lag hier zum Zeitpunkt 0 h ebenfalls etwas unter der Menge zum Zeitpunkt 4 h und war in einem *tec1Δ*- und einem *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*- Stamm auf weniger als 5 % reduziert. In deutlichem Kontrast zu einem *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamm mit *P_{CMV}*-getriebenem *rtTA*, konnte in einem Stamm mit *P_{STE12}*-getriebenem *rtTA* bereits nach 4 h mit Doxyzyklin eine zu einem *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm vergleichbare Menge an Tec1 von 145 % gemessen werden (vergleiche Abb. 30 A und Abb. 31 A). Diese stieg nach 6 h auf rund 200 % an. Wie bereits für die Stämme mit *P_{CMV}*-getriebenem *rtTA* gezeigt (Abb. 30 D), wies der *P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1*-Kontrollstamm eine starke Adhäsion in Ab- und Anwesenheit von Doxyzyklin auf, und der *tec1Δ*-Stamm sowie der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*-Stamm eine signifikant reduzierte Adhäsion (Abb. 31 D). Im Unterschied zu einem *P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1*-Stamm mit *P_{CMV}*-getriebenem *rtTA* war die Adhäsionsfähigkeit des Stamms mit *P_{STE12}*-getriebenem *rtTA* in Anwesenheit von Doxyzyklin mit der Adhäsionsfähigkeit des Kontrollstamms vergleichbar.

Diese Beobachtungen bestätigen, dass der *CMV*-Promotor nicht für die Expression des *rtTA* in *S. cerevisiae* geeignet ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es möglich ist die *TEC1*-Expression durch die Insertion einer einzigen Bindestelle für den rtTA synthetisch zu kontrollieren.

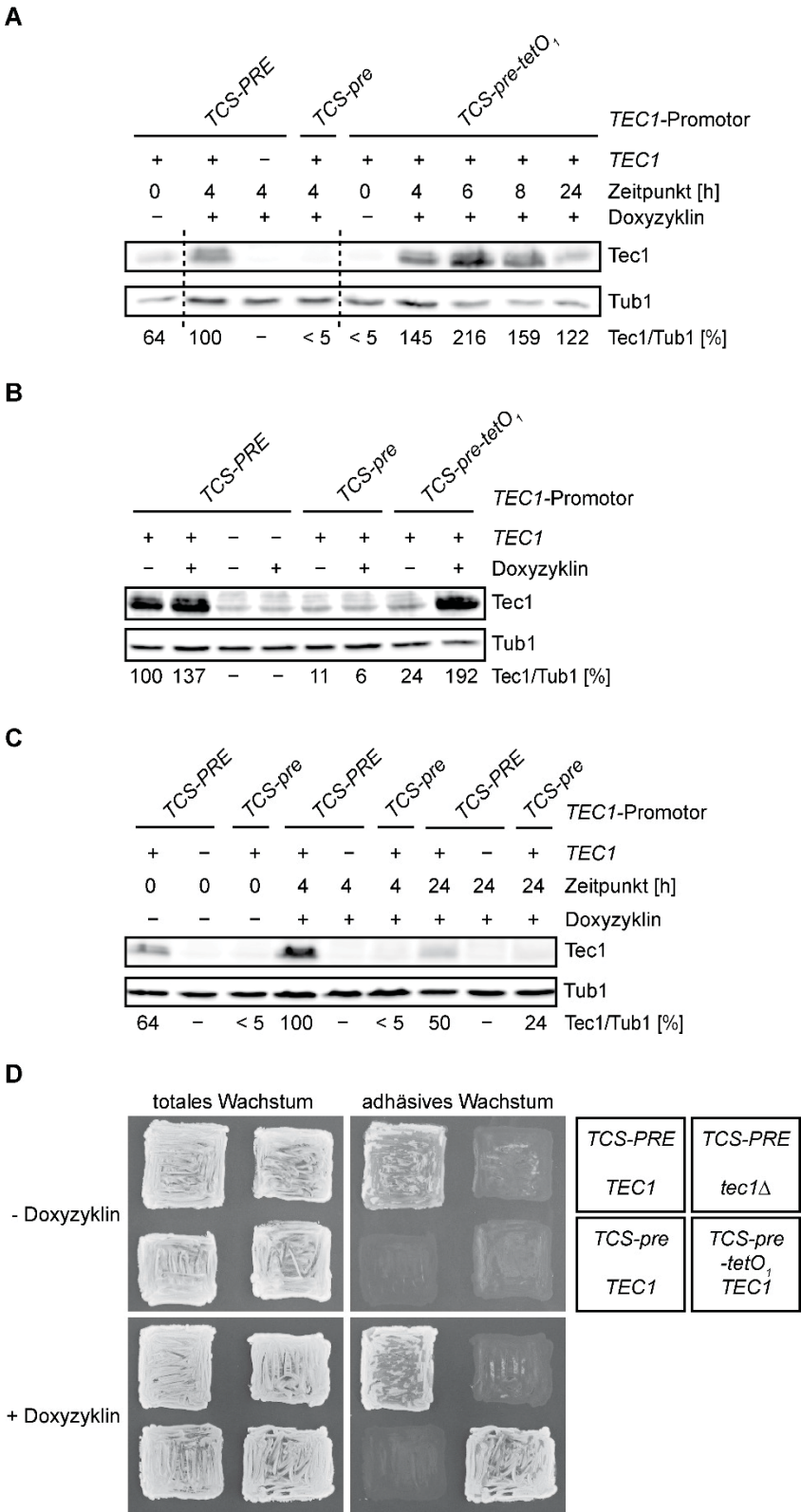


Abb. 31: *P_{STE12}-rtTA*-vermittelte, Doxyzyklin-abhängige *TEC1*-Expression in einem *S. cerevisiae*-Stamm mit einer einzelnen tet-Operatorsequenz im *TEC1*-Promotor.
Nach dreistündiger Inkubation in SC-Medium mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin und 0,2 mM Uracil wurde von den *S. cerevisiae*-Stämmen YHUM2439/YHUM2440 (*P_{TEC1}-TCS-PRE-TEC1 P_{STE12}-rtTA*), YHUM2435/YHUM2436 (*tec1Δ P_{STE12}-rtTA*), YHUM2441/YHUM2442 (*P_{TEC1}-TCS-pre-TEC1 P_{STE12}-rtTA*), YHUM2443/YHUM2444 (*P_{TEC1}-TCS-pre-tetO₁ P_{STE12}-rtTA*) zunächst für den Zeitpunkt 0 h eine Probe für die Proteinextraktion entnommen. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und für weitere 8 h ohne (- Doxyzyklin) oder mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) inkubiert. (Fortsetzung am Anfang der nächsten Seite).

Abb. 31 (Fortsetzung): Es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die Proteinextraktion entnommen (nicht für alle Stämme gezeigt). Die Tec1-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot unter Verwendung von Tec1- und Tub1-spezifischen Antikörpern in vier unabhängigen Messungen bestimmt. Die Werte geben die Tec1-Proteinmenge als Prozentsatz relativ zur Tec1-Proteinmenge in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ $P_{STE12-rtTA}$ -Kontrollstamm an. **(A)** Western-Analyse zur Bestimmung der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression über 24 h. **(B)** Vergleich der Doxyzyklin-abhängigen *TEC1*-Expression zum Zeitpunkt 4 h. **(C)** Vergleich der *TEC1*-Expression in Anwesenheit von Doxyzyklin in einem $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1}$ -Stamm, einem *tec1Δ*-Stamm und einem $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Stamm zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h und 24 h. **(D)** Bestimmung der Flo11-abhängigen Adhäsion an Agar mittels Waschtest. Um das adhäsive Wachstum zu bestimmen, wurden die unter (A) genannten Stämme für fünf Tage auf YEPD-Agar ohne (– Doxyzyklin) und mit 50 µg/ml Doxyzyklin (+ Doxyzyklin) angezogen und die Platten vor (totales Wachstum) und nach der Entfernung nicht-adhäsiver Zellen (adhäsives Wachstum) fotografiert.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verschaltung von Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle ihrer Zielgene am Beispiel des TEA-Transkriptionsfaktors Tec1 und des Transkriptionsfaktors Ste12 untersucht. Es sollte bestimmt werden, wie Tec1 auf der Ebene der Transkription und der Translation reguliert wird und wie sich diese Regulation auf die Kontrolle von Zielgenen am Beispiel von *FLO11* auswirkt.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle der *TEC1*-Expression unter vegetativen und Konjugationsbedingungen größtenteils durch die PREs erfolgt und die TCS-Elemente nicht benötigt werden. Zudem werden die *TEC1*-Transkription und die Protein-stabilität durch verschiedene Nährstoffsignale unabhängig von den TCS-Elementen und PREs kontrolliert. Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mpt5 die Translation von *TEC1* vermutlich über den 3'-UTR kontrolliert. Im letzten Teil der Arbeit wurde die Ste12-vermittelte Kontrolle der *TEC1*-Expression durch eine synthetische, Doxyzyklin-vermittelte Kontrolle ersetzt.

Im Folgenden wird zunächst die Rolle der PRE- und TCS-vermittelten Kontrolle der *TEC1*-Expression näher betrachtet und mögliche Mechanismen für die Nährstoffregulation der *TEC1*-Expression vorgestellt. Anschließend wird die Regulation der *TEC1*-Translation durch Mpt5 besprochen. Weiterhin wird auf die Regulation der Tec1-Proteinstabilität unter verschiedenen Umweltbedingungen sowie deren Auswirkungen auf das Tec1-Zielgen *FLO11* eingegangen. Abschließend wird diskutiert, wie sich eine synthetische Regulation auf die *TEC1*-Expression auswirkt und die Verschaltung von Transkriptionsfaktoren innerhalb von Transkriptionsnetzwerken näher beleuchtet.

3.1 Die PREs sind für die *TEC1*-Expression unter vegetativen Bedingungen wichtig und vermitteln die Pheromon-abhängige Induktion der *TEC1*-Expression

Frühere Studien zeigen, dass sowohl die *TEC1*-Expression, als auch die Tec1-Proteinstabilität stark durch Pheromon reguliert ist. Jedoch ist bislang unklar, weshalb die *TEC1*-Expression unter Konjugationsbedingungen durch die Bindung von Ste12 an mehrere PREs im *TEC1*-Promotor induziert und das Tec1-Protein aber abgebaut wird (Oehlen and Cross, 1998; Bao et al., 2004; Brückner et al., 2004; Chou et al., 2004). Zudem wurde postuliert, dass die *TEC1*-Expression autoregulatorisch über ein FRE im *TEC1*-Promotor erfolgt (Madhani and Fink, 1997). Jedoch finden sich Hinweise, dass Tec1 nicht für die Kontrolle der *TEC1*-Expression benötigt wird, da die Deletion des *TEC1*-Gens die Expression eines *P_{TEC1}-lacZ*-Reportergens

nicht beeinflusst (Köhler et al., 2002). Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit, die physiologische Relevanz der beiden Regelkreise zu bestimmen, die auf den *TEC1*-Promotor einwirken.

Es konnte gezeigt werden, dass Tec1 unter vegetativen Bedingungen nicht für die Kontrolle der *TEC1*-Expression benötigt wird, da die Mutation der TCS-Elemente bei einem guten Nährstoffangebot keinen Effekt auf die Expression von *TEC1* hatte. Es fiel allerdings auf, dass die Mutation der TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor die *in vitro* DNA-Bindung beeinträchtigte, jedoch nicht komplett verhinderte, obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass diese Mutation die Bindung von Tec1 an ein FRE verhindert (Madhani and Fink, 1997; Heise et al., 2010). Möglicherweise befinden sich weitere, niederaffine TCS-Elemente im *TEC1*-Promotor, die gebunden werden können. Dennoch spielt die Kontrolle der *TEC1*-Expression durch Tec1 unter vegetativen Bedingungen offensichtlich keine Rolle, da die Expression eines *P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**- bzw. eines *P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**-Reportergens in einem *tec1Δ*-Stamm unter vegetativen Bedingungen unverändert war. Genauen Aufschluss darüber ob und unter welchen Bedingungen Tec1 *in vivo* an seinen Promotor bindet, könnte eine zukünftige ChIP-Analyse geben.

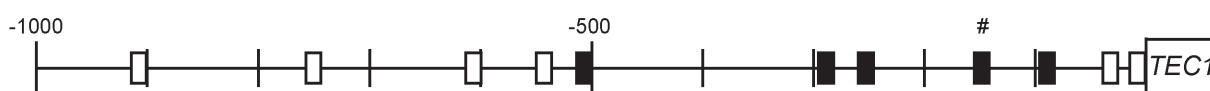
Auch wurde bereits vermutet, dass die basale Expression von *TEC1* vermutlich über PREs erfolgt und von Konjugations-spezifischen Komponenten abhängt (Oehlen and Cross, 1998). Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Stämmen, in denen die PREs mutiert waren, bestätigt werden. In diesen Stämmen war die Expression von *TEC1* stark reduziert und die Deletion von *STE12* hatte einen negativen Einfluss auf die Expression eines *P_{TEC1-TCS-PRE}-CFP**- bzw. eines *P_{TEC1-TCS-PRE-3} × mTurquoise 2**- Reportergens unter vegetativen Bedingungen. Hier führte die Mutation der PREs im *TEC1*-Promotor auch zum vollständigen Verlust der *in vitro* DNA-Bindung durch Ste12. Die Funktion dieser Regulation von Ste12 ist bislang unklar, jedoch könnte es sich hierbei um eine sogenannte „Feedforward“-Schleife handeln, um die Expression von *FLO11* zu kontrollieren (vgl. Kapitel 3.6).

Da Tec1 unter vegetativen Bedingungen offensichtlich nicht entscheidend für die Regulation der *TEC1*-Expression ist, stellt sich die Frage, ob es Bedingungen gibt, unter denen dieser Regelkreis benötigt wird. Um näher zu beleuchten, unter welchen Bedingungen die Regulation über Ste12 oder Tec1 erfolgt, wurde der Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen untersucht. Auch hier zeigte sich, dass unter Konjugationsbedingungen die Regulation der *TEC1*-Expression nicht über den TCS-vermittelten Regelkreis geschieht, sondern von Ste12 und den PREs abhängig ist. Die Expression von *TEC1* war in einem Stamm, in dem die TCS-Elemente des *TEC1*-Promotors mutiert sind, bei Applikation von Pheromon vergleichbar zu einem Stamm mit einem

unveränderten Promotor. Im Gegensatz dazu war die *TEC1*-Transkriptmenge in einem Stamm, in dem die PREs des *TEC1*-Promotors mutiert waren, stark reduziert. Somit konnte nun erstmals direkt gezeigt werden, dass die PREs im *TEC1*-Promotor eine entscheidende Rolle sowohl für die basale als auch die Pheromon-induzierte *TEC1*-Transkription spielen. Zudem konnte die Transkriptionsaktivierung des *TEC1*-Promotors mit Hilfe Fluoreszenz-basierter transkriptioneller Reportergene *in vivo* untersucht werden. Hier zeigte sich auch ein potentieller negativer Einfluss von Tec1 auf seine eigene Expression, da die gleichzeitige Deletion von *TEC1* und die Mutation der TCS-Elemente zu einer erhöhten Transkriptionsaktivierung eines $P_{TEC1-tcs-PRE-CFP^*}$ - bzw. eines $P_{TEC1-tcs-PRE-3 \times mTurquoise 2^*}$ -Reportergens führten. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen sowohl in den haploiden, als auch in den diploiden $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1}$ -Stämmen über den Mengen in $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1}$ -Stämmen lagen.

Auffällig ist, dass die Konfiguration der PREs im *TEC1*-Promotor den Voraussetzungen für eine effiziente Transkriptionsaktivierung widerspricht. Somit müssen sich weitere regulatorische Bereiche im *TEC1*-Promotor befinden, welche eine Transkriptionsaktivierung durch Ste12-Homodimere oder -Heterodimere mit einem weiteren unbekannten Transkriptionsfaktor erlauben. In der Tat zeigt eine Studie, dass Pheromon-induzierte Gene, welche nur ein einzelnes PRE in ihrer Promotorregion haben, oft eine PRE-ähnliche Sequenz besitzen, deren Position und Orientierung relativ zum PRE in einer günstigen Konfiguration sind (Su et al., 2010).

A



B



Abb. 32: Orientierung der PREs und PRE-ähnlichen Elemente im *TEC1*-Promotor.

(A) Schematische Darstellung der Lage der PREs (schwarz) und PRE-ähnlichen Elemente (weiß) im *TEC1*-Promotor des Laborstamms S288c im Bereich –1 bis –1000. Das mit # gekennzeichnete PRE ist zwischen S288c und $\Sigma 1278b$ nicht konserviert. In $\Sigma 1278b$ befindet sich an dieser Position ein PRE-ähnliches Element. (B) Gezeigt sind die Sequenzen und Orientierung der PREs und PRE-ähnlichen Elemente im *TEC1*-Promotor des Laborstamms S288c im Bereich –1 (3') bis –1000 (5'). Die Zahlen geben den Abstand zwischen den Elementen in bp an.

Im *TEC1*-Promotor des Laborstamms S288c finden sich sechs PRE-ähnliche Sequenzen und im *TEC1*-Promotor des Laborstamms Σ 1278b sieben PRE-ähnliche Sequenzen, da PRE II nicht zwischen den beiden Stämmen konserviert ist (Abb. 32). Zwei dieser PRE-ähnlichen Sequenzen liegen in einer günstigen Konfiguration relativ zu den benachbarten PREs vor. Der Abstand zwischen dem PRE an Position –88 bis –94 und dem nächsten stromabwärts gelegenen PRE-ähnlichen Element beträgt 57 bp und sie befinden sich in einer aufeinander zulaufender Orientierung. Der Abstand zwischen dem PRE an Position –503 bis –509 und dem vorletzten stromaufwärts gelegenen PRE-ähnlichen Element beträgt 83 bp und sie liegen in einer repetitiven Konfiguration vor. Ob diese Elemente *in vivo* durch Ste12 Homodimere gebunden werden, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die fehlende Konservierung von PRE II zwischen den Laborstämmen S288c und Σ 1278b könnte evolutionär begründet sein. So sind beispielsweise Unterschiede in der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Zielgene zwischen den nahe verwandten Spezies *S. cerevisiae*, *Saccharomyces mikatae* und *Saccharomyces bayanus*, oder zwischen verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen hauptsächlich in Unterschieden bei den *cis*-Elementen begründet (Borneman et al., 2007; Zheng et al., 2010). Durch Mutationen können in verschiedenen Stämmen oder verwandten Spezies neue Bindestellen entstehen, oder vorhandene Bindestellen verloren gehen, und ermöglichen so die rasche Anpassung der Genexpression an neue ökologische Nischen (Borneman et al., 2007; Li and Johnson, 2010).

3.2 Die Expression von *TEC1* wird durch Nährstoffe reguliert

Die vorliegende Arbeit liefert einen Überblick, wie die Expression von *TEC1* unter verschiedenen Stressbedingungen kontrolliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Nährstoffe die *TEC1*-Expression beeinflussen und die TCS-Elemente und PREs im *TEC1*-Promotor hierfür nicht notwendig sind. So führte Glukosemangel sowohl im Kontrollstamm als auch in Stämmen mit den verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten zu stark erhöhten *TEC1*-Transkriptmengen. Dies deutet darauf hin, dass die Glukoseverfügbarkeit die *TEC1*-Expression über andere Mechanismen als die Bindung von Tec1 und/oder Ste12 an TCS-Elemente beziehungsweise PREs kontrollieren muss. Allerdings scheint Ste12 unter diesen Bedingungen trotzdem eine Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle von *TEC1* zu spielen, da die *TEC1*-Expression in einem *ste12Δ*-Stamm nicht durch Glukose induziert werden konnte. Ste12 könnte beispielsweise mit einem anderen Transkriptionsfaktor, welcher für die Transkriptionsaktivierung von *TEC1* unter Glukosemangelbedingungen benötigt wird,

kooperieren. Alternativ wäre eine potentielle Kontrolle dieses unbekannten Faktors durch Ste12 denkbar.

Glukosemangel ist, neben anderen Signalen, ein Auslöser des adhäsiven Wachstums. Hierbei kommt es zu morphologischen Veränderungen in der Zelle: Sie sind elongiert, ihre Polarität wird umorganisiert und sie weisen eine verstärkte Flo11-vermittelte Zell-Zell- und Zell-Oberflächenadhäsion auf (Gimeno et al., 1992; Gimeno and Fink, 1992; Kron and Gow, 1995; Mösch, 2000; Gancedo, 2001; Cullen and Sprague, 2012). Signalwege, welche die *FLO11*-Expression als Antwort auf eine Unterversorgung mit Glukose aktivieren, sind der cAMP/PKA-Signalweg und der Snf1/Glukose-Repressionsweg (Rupp et al., 1999; Gagiano et al., 2002; Vyas et al., 2003; Zaman et al., 2008). Möglicherweise ist die Regulation der *TEC1*-Expression als Antwort auf Nährstoffsignale komplexer als bisher angenommen und wird ebenfalls durch den cAMP/PKA-Signalweg und/oder den Snf1/Glukose-Repressionsweg kontrolliert. Für eine Regulation von *TEC1* durch den cAMP/PKA-Signalweg spricht die Beobachtung, dass sich im *TEC1*-Promotor zwei Bereiche befinden, die durch Phd1 gebunden werden (Abb. 33) (Borneman et al., 2006; Zhu et al., 2009; Rhee and Pugh, 2011).

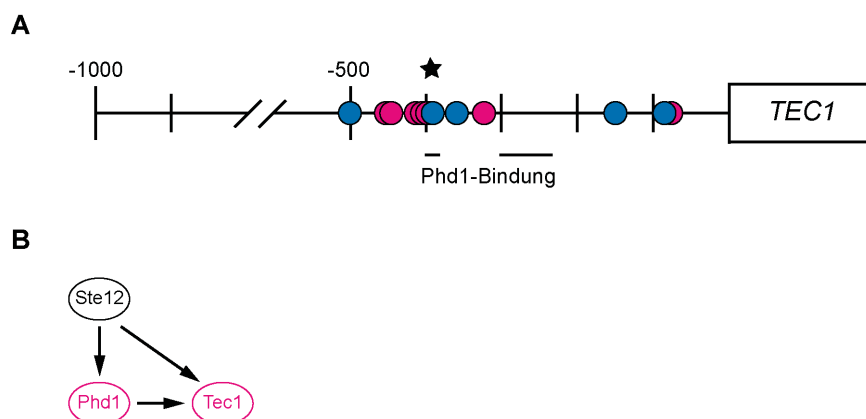


Abb. 33: Kontrolle der *TEC1*-Expression durch die Transkriptionsfaktoren Ste12, Tec1 und Phd1.

(A) Erweiterte schematische Darstellung der Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *TEC1*-Promotor. Im *TEC1*-Promotor finden sich neben den PREs (blau), den TCS-Elementen (rot) und dem FRE (Stern) auch zwei Bereiche, in welchen Phd1 bindet (Balken). (B) Die Expression von *TEC1* wird über eine „Feedforward“-Schleife kontrolliert. Die beiden Transkriptionsfaktoren Ste12 und Phd1 regulieren die Transkription von *TEC1*. Zudem wird die Expression von *PHD1* teilweise durch Ste12 kontrolliert.

Auf diese Weise könnte die Zelle bei Glukosemangel die *FLO11*-Expression zum einen direkt durch die Aktivierung von Flo8 und die Inaktivierung von Sfl1 kontrollieren. Zum anderen könnte sie als zusätzlicher Mechanismus durch die Kontrolle der *TEC1*-Expression gesteuert werden. Da die Transkription von *PHD1* zum Teil durch Ste12 kontrolliert wird (Raithatha et al., 2012), würde dies auch erklären, weshalb im *ste12Δ*-Stamm, im Gegensatz zu einem Stamm mit mutierten PREs, kein Anstieg der *TEC1*-Expression bei Glukosemangel beobachtet werden konnte. Die Transkription von *TEC1* wird somit vermutlich über eine „Feedforward“-Schleife

durch Ste12 und Phd1 kontrolliert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die *TEC1*-Transkriptmenge in einem *phd1Δ*-Stamm unter Glukosemangel reduziert ist.

Unter Stickstoffmangel waren die *TEC1*-Transkripte im Kontrollstamm, sowie den *P_{TEC1}*-Mutanten, analog zu den unter Glukosemangel gemessenen Transkriptmengen, ebenfalls erhöht. Auch hier scheint die Regulation über TCS- beziehungsweise PRE-unabhängige Mechanismen zu erfolgen und ebenso von Ste12 abhängig zu sein. Bisher ist nichts darüber bekannt, ob und wie Stickstoff die Expression von *TEC1* beeinflusst. Untersuchungen mit Rapamycin zeigten jedoch, dass die *TEC1*-Transkriptmenge nach 70-minütiger Inkubation unverändert ist (Brückner et al., 2011). Rapamycin inhibiert TORK1, welcher verschiedene Prozesse in der Zelle nährstoffabhängig kontrolliert und die Zugabe von Rapamycin führt zu einem ähnlichen Phänotyp wie Stickstoffmangel (Heitman et al., 1991; Barbet et al., 1996). Folglich wird *TEC1* auf der Transkriptionsebene vermutlich nicht durch den TOR-Signalweg kontrolliert. Allerdings müsste dies durch weitere Messungen bestätigt werden. Für eine Regulation durch einen anderen Signalweg würden hier ebenfalls der cAMP/PKA-Signalweg sowie der Snf1/Glukose-Repressionsweg in Frage kommen, für die in diploiden Zellen eine Beteiligung an der Regulation des Pseudohyphenwachstums beschrieben wurde (Lorenz and Heitman, 1997, 1998a, 1998b; Kuchin et al., 2002; Van Nuland et al., 2006). Für eine Beteiligung des cAMP/PKA-Signalwegs an der Stickstoff-abhängigen Kontrolle von *TEC1* würde die oben beschriebene potentielle Regulation von *TEC1* durch Phd1 sprechen.

Im Kontrast zu den unter Glukose- und Stickstoffmangel beobachteten Effekten, hatte die Applikation von 3-AT keinen Einfluss auf die *TEC1*-Expression. Obwohl Tec1 in diploiden Zellen nicht für die Kontrolle der Adhäsion unter Aminosäuremangel benötigt wird, aktiviert 3-AT die *TEC1*-Expression in diploiden Zellen (Braus et al., 2003; Kleinschmidt et al., 2005). Da in dieser Arbeit haploide Hefestämme verwendet wurden, wäre es denkbar, dass 3-AT die *TEC1*-Expression in haploiden Zellen nicht beeinflusst. Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz könnte der Zeitpunkt sein, zu dem die *TEC1*-Expression bestimmt wurde. Die *TEC1*-Transkripte wurden hier nach dreistündiger Inkubation mit 3-AT gemessen, wohingegen die Zellen in Kleinschmidt et al. für 8 h mit 3-AT inkubiert wurden. Somit müsste eine weitere Analyse zeigen, ob die *TEC1*-Transkriptmenge in haploiden Zellen nach achtstündiger Inkubation zunimmt.

3.3 Der 3'-UTR von *TEC1* wird vermutlich für die Regulation durch Mpt5 benötigt

In früheren Studien fiel auf, dass die Tec1-YFP Menge in *ste7Δ*-Stämmen erhöht war und die Adhäsion an Agar nicht beeinträchtigt wurde (Weisser, 2011; van der Felden, 2012). Die MAPKK Ste7 kontrolliert die beiden MAPK Fus3 und Kss1, welche wiederum Ste12 kontrollieren, das für die Expression von *TEC1* wichtig ist. Somit führt die Deletion von *STE7* zu einer Unterbrechung der Signalweiterleitung im Fus3/Kss1-MAPK Modul und bewirkt eine signifikante Reduktion der *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmenge (Brückner et al., 2004). Allerdings konnten Prinz et al. (2007) auch zeigen, dass die Translation der *TEC1*-mRNA negativ durch das RNA-Bindeprotein Mpt5 reguliert ist. Da sich weder in der 3'-UTR noch in der 5'-UTR von *TEC1* ein Mpt5 Bindemotiv befindet, wird davon ausgegangen, dass Mpt5 direkt oder indirekt an andere Sequenzen bindet (Prinz et al., 2007). Hier konnte nun gezeigt werden, dass die Deletion von *STE7* in einem Stamm mit C-terminal YFP-markiertem Tec1 zur Reduktion der *TEC1*-Transkripte führte, nicht aber die Tec1-Proteinmenge beeinträchtigte. Bei der Markierung mit YFP wird auch der native Terminator, sowie der 3'-UTR von *TEC1* durch den Terminator und den 3'-UTR der Kasse zur C-terminalen Markierung ersetzt. Somit scheint die Regulation von *TEC1* durch Mpt5 über den 3'-UTR zu erfolgen und die C-terminale YFP-Markierung führt zu einem Verlust dieser Regulation. Dadurch wird die Translation der *TEC1*-Transkripte nicht mehr reprimiert und es kommt zu erhöhten Tec1-Proteinmengen in der Zelle.

Interessant ist hierbei, dass der Verlust der *TEC1*-Regulation durch Mpt5 zu keiner verminderten Adhäsionsfähigkeit führt, obwohl die Deletion von Mpt5 eine starke Reduktion der *FLO11*-Transkripte und eine leicht reduzierte Adhäsion an Agar bewirkt (Lo et al., 2012). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Mpt5 die beiden Repressoren von *FLO11*, Nrg1 und Nrg2, negativ reguliert (Lo et al., 2012). Fehlt Mpt5, liegt eine erhöhte Menge an Nrg1, Nrg2 und vermutlich Tec1 in der Zelle vor, welche *FLO11* antagonistisch regulieren. Aufgrund der reduzierten *FLO11*-Transkripte und der Adhäsionsfähigkeit eines *mpt5Δ*-Stamms scheint die reprimierende Wirkung von Nrg1 und Nrg2 stärker als die aktivierende Wirkung von Tec1 zu sein. Fehlt hingegen der 3'-UTR von *TEC1*, liegt eine erhöhte Menge an Tec1 und eine normale Menge an Nrg1 und Nrg2 in der Zelle vor. In diesem Fall wäre es denkbar, dass Tec1 *FLO11* aktivieren kann und es somit zur Oberflächenadhäsion kommt.

3.4 Regulation der Tec1-Proteinstabilität durch Nährstoffe

Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Tec1-Proteinstabilität durch verschiedene Umweltsignale beeinflusst wird. Zudem scheint die Kontrolle der Expression seines Zielgens *FLO11* unter verschiedenen Umwelteinflüssen teilweise Tec1- und Ste12-unabhängig zu erfolgen. Es konnten sowohl in einem Kontrollstamm als auch in den Stämmen mit den verschiedenen *TEC1*-Promotorvarianten unter Glukosemangel erhöhte Tec1-Proteinmengen gemessen werden, welche mit den gemessenen *TEC1*-Transkriptmengen korrelierten. Analog zu früheren Untersuchungen konnte zudem eine Zunahme der *FLO11*-Transkriptmengen beobachtet werden (Gagiano et al., 1999; Kuchin et al., 2002). Die Menge an *FLO11*-Transkript korrelierte unter Kontrollbedingungen mit der Tec1-Proteinmenge. Da in der *ste12Δ*-, der *tec1Δ*-, der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*- sowie der *P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1*-Mutante ebenfalls eine Induktion der *FLO11*-Expression durch Glukosemangel beobachtet werden konnte, erfolgt die Kontrolle vermutlich über den cAMP/PKA-Signalweg und den Snf1/Glukose-Repressionsweg. Für eine vollständige Induktion scheinen allerdings Tec1 und Ste12 benötigt zu werden, da die *FLO11*-Transkriptmengen in der *ste12Δ*-, der *tec1Δ*-, der *P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1*- sowie der *P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1*-Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm und der *P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1*-Mutante reduziert waren.

Die Reduktion der Tec1-Proteinmengen unter Stickstoffmangel steht in starkem Kontrast zu den in dieser Arbeit gemessenen, erhöhten *TEC1*-Transkriptmengen sowie der in einer früheren Studie demonstrierten Zunahme der Tec1-Proteinmenge (Brückner et al., 2011). Allerdings wurden die Tec1-Proteinmengen zu verschiedenen Zeitpunkten und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. In Brückner et al. wurde die Tec1-Proteinmenge in SC-Medium, welches zwar kein Ammoniumsulfat, dafür aber alle Standard-Aminosäuren enthielt, gemessen. *S. cerevisiae* ist in der Lage neben Ammonium auch andere Stickstoffquellen, wie beispielsweise Glutamin, Glutamat oder Asparagin als bevorzugte Stickstoffquelle zu nutzen (Marzluf, 1997; Ter Schure et al., 2000; Gagiano et al., 2002; Zaman et al., 2008). In Abwesenheit der bevorzugten Stickstoffquellen können auch die meisten Aminosäuren als Stickstoffquelle genutzt werden. Somit handelt es sich vermutlich nicht um einen kritischen Stickstoffmangel und es ist fraglich, ob der TORK1 unter diesen Bedingungen inaktiviert wird. Des Weiteren wurden in Brückner et al. die Proteinmengen bereits nach 70 min bestimmt. Es wäre denkbar, dass die Tec1-Menge bei Stickstoffmangel zunächst zunimmt, um beispielsweise *FLO11* zu aktivieren und das Tec1-Protein dann zu einem späteren Zeitpunkt abgebaut wird. Hierfür würden auch die erhöhten *TEC1*-Transkriptmengen unter Stickstoffmangel sprechen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob der TORK1 doch an der Regulation der Tec1-

Stabilität unter Stickstoffmangel beteiligt ist, oder ob Tec1 durch einen anderen Signalweg kontrolliert wird.

Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, wie Stickstoffmangel die *FLO11*-mRNA Menge beeinflusst, sind widersprüchlich. In Abhängigkeit der Ploidie, dem Zeitpunkt der Messung und der noch verfügbaren Stickstoffmenge konnten sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der *FLO11*-Transkripte beobachtet werden (Lo and Dranginis, 1998; Braus et al., 2003; Vinod et al., 2008). In dieser Studie konnte aufgrund der hohen Standardabweichung keine Aussage über die *FLO11*-Expression getroffen werden. Da Stickstoffmangel jedoch das Pseudohyphenwachstum induziert, ist davon auszugehen, dass es zumindest in diploiden Hefezellen zu einem Anstieg an *FLO11* kommen muss. Dementsprechend konnte in einem diploiden Kontrollstamm sowie in der *P_{TEC1-ics}-PRE-TEC1*-Mutante auch die Ausbildung von Pseudohyphen beobachtet werden, wohingegen die Deletion von *TEC1*, *FLO11* oder die Mutation der PREs oder der TCS-Elemente und PREs die Pseudohyphenbildung blockierte. In diploiden *S. cerevisiae*-Zellen erfolgt die Regulation von *FLO11* unter Stickstoffmangel über Mep2 und die PKA, den Snf1/Glukose-Repressionsweg und den TOR-Signalweg (Lorenz and Heitman, 1997, 1998a, 1998b; Cutler et al., 2001; Kuchin et al., 2002; Van Nuland et al., 2006; Vinod et al., 2008). Aber auch für das MAPK-Modul konnte eine Beteiligung gezeigt werden und Tec1 wird für Kontrolle des pseudohyphalen Wachstums benötigt (Liu et al., 1993; Mösch et al., 1996).

Die Applikation des Histidin-Analogon 3-AT hatte ebenfalls eine Reduktion der Tec1-Proteinmengen zur Folge. Eine Unterversorgung mit Aminosäuren kann, wie die Zugabe von Rapamycin, zur Hemmung des TORK1 führen (Neklesa and Davis, 2009). Da für Rapamycin bereits eine Regulation der Tec1-Proteinstabilität durch den TOR-Signalweg beschrieben wurde (Brückner et al., 2011), wäre es denkbar, dass die Tec1-Proteinstabilität unter Aminosäuremangel analog reguliert wird. Dies müsste jedoch noch detailliert untersucht werden.

Aufgrund einer hohen Standardabweichung konnte keine Aussage über den Einfluss von 3-AT auf die Expression von *FLO11* getroffen werden. Jedoch konnten Braus et al. (2003) zeigen, dass die Zugabe von 3-AT sowohl in haploiden als auch in diploiden *S. cerevisiae*-Zellen das adhäsive Wachstum aktiviert und zu einer Zunahme der *FLO11*-Transkripte führt. Dieser Prozess wird über Gcn2 und Gcn4 durch den generellen Aminosäurekontrollweg kontrolliert und ist in diploiden Zellen abhängig von Tpk2 und Flo8. Die beiden Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 werden hingegen nicht benötigt (Braus et al., 2003).

Obwohl osmotischer Stress keinen Effekt auf die *TEC1*-Transkript und Tec1-Proteinmengen hatte, konnte eine leichte Induktion der *FLO11*-Expression beobachtet werden, welche mit früheren Beobachtungen übereinstimmt (Jansen et al., 2001). Allerdings ist bisher nicht verstanden, wie dies reguliert wird. Es konnte nun gezeigt werden, dass diese Induktion nicht von Tec1 und Ste12 abzuhängen scheint und somit das Fus3/Kss1-MAPK Modul vermutlich nicht an dieser Regulation beteiligt ist.

3.5 Die Ste12-gesteuerte Expression von *TEC1* kann durch ein einzelnes, synthetisches *cis*-Element gezielt ersetzt werden

Die synthetische Manipulation von Signalwegen ermöglicht die gezielte Nutzung von Organismen mit neuen Eigenschaften in der Biomedizin und Biotechnologie (Kiel et al., 2010). Beispiele hierfür sind die Nutzung von Pro- und Eukaryoten für die Herstellung neuer Stoffe, wie beispielweise Terpenoide in *E. coli* oder biologischer Treibstoffe in Hefe (Martin et al., 2003; Petrovič, 2015). Voraussetzung für die Entwicklung synthetischer Signalwege ist, dass die Funktionsweise natürlich vorkommender Signalwege genau bekannt ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die *TEC1*-Regulation sollen dazu beitragen, ein quantitatives Modell des Fus3/Kss1-MAPK Moduls zu erstellen, welches in Zukunft für die Entwicklung solcher synthetischen Module genutzt werden kann. Durch die Insertion einer einzelnen Bindestelle für den Tetrazyklin-regulierten rtTA in den *TEC1*-Promotor wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob eine Ste12-unabhängige synthetische Regulation über ein einzelnes *cis*-wirkendes Element möglich ist. Unter Verwendung des ursprünglichen *rtTA*, welcher durch den *CMV*-Promotor konstitutiv exprimiert wird, konnte allerdings keine Expression beobachtet werden. Eine neuere Studie zeigt, dass der aus dem humanen Cytomegalievirus stammende Promotor im Vergleich zu den aus *S. cerevisiae* stammenden *CYC1*- und *TEF1*-Promotoren eine signifikant schwächere Aktivität aufweist (Moriyoshi, 2009). Des Weiteren gewährleistet der *CMV*-Promotor keine konstitutive Expression unter Stressbedingungen, da er beispielsweise durch eine erhöhte Salzkonzentration im Medium über die beiden Transkriptionsfaktoren Sko1 und Hot1 aktiviert wird (Romero-Santacreu et al., 2010).

Unter Verwendung des *STE12*-Promotors für die Expression des *rtTA* gelang eine effiziente und gezielte Transkriptionsaktivierung von *TEC1*, die vergleichbar zur Kontrolle war. Somit kann bereits durch die Insertion einer einzelnen Bindestelle für den rtTA eine synthetische Kontrolle des Zielgens ermöglicht werden. Möglicherweise kann durch die Insertion des tetO₁ an einer anderen Position im *TEC1*-Promotor sogar eine noch stärkere

Transkriptionsaktivierung beobachtet werden, da die Position der Operatorsequenz die Aktivität des Promotors beeinflussen kann (Hamann et al., 1997; Murphy et al., 2007).

Bei dem *STE12*-Promotor handelt es sich vermutlich ebenfalls nicht um einen konstitutiv exprimierenden Promotor, da sich mehrere PREs in seiner Promotorregion finden (Errede and Ammerer, 1989; Dolan et al., 1989). Für weiterführende Arbeiten sollte der *rtTA* von einem konstitutiven Promotor, wie beispielsweise dem *CYCI*- und *TEF1*-Promotor, exprimiert werden. Auch sollten zukünftige Messungen mit einem *TEC1*-Promotor erfolgen, in welchem die TCS-Elemente und PREs mutiert und der tet-Operator integriert wurden. Hier wurde ein Promotor verwendet, in dem lediglich die PREs mutiert waren. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter induzierenden Bedingungen (Zugabe von Doxzyklin) Ste12 die *TEC1*-Expression ebenfalls beeinflusst, indem es über Tec1 an den *TEC1*-Promotor herangeführt wird.

3.6 Die beiden Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 sind auf mehreren Ebenen komplex miteinander verschaltet

Die vorliegende Arbeit ermöglicht neue Einblicke in die Verschaltung der beiden Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12. Bislang wurden Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren Zielgenen hauptsächlich im Rahmen genomweiter Lokalisations-Analysen durchgeführt. Hier wurde nun die transkriptionelle Kontrolle eines Transkriptionsfaktors durch zwei verschiedene Mechanismen am Beispiel von Tec1 im Detail untersucht.

Die Interaktion oder Verschaltung von Transkriptionsfaktoren mit ihren Zielgenen kann durch Transkriptionsnetzwerke beschrieben werden (Babu et al., 2004; Alon, 2007). Studien zeigen, dass die Architektur eines Transkriptionsnetzwerks aus einer Reihe weniger, wiederkehrender Muster, den Netzwerkmotiven, besteht (Shen-Orr et al., 2002; Milo et al., 2002; Babu et al., 2004; Alon, 2007). Sie wurden zunächst in *E. coli* identifiziert, finden sich aber auch in Hefe und bis hin zum Menschen (Thieffry et al., 1998; Shen-Orr et al., 2002; Lee et al., 2002; Alon, 2007). Dabei hat jedes Netzwerkmotiv eine spezifische Funktion bei der Verarbeitung von Signalen, welche jedoch experimentell noch weiter untersucht werden müssen, um beispielsweise die Dynamik des Systems, in welchem das Netzwerkmotiv vorkommt, näher zu charakterisieren (Alon, 2007). Bei der Autoregulation, welche in dieser Arbeit für Tec1 beschrieben wurde, handelt es sich um ein solches Netzwerkmotiv. Man unterscheidet hierbei zwischen einer negativen und einer positiven Autoregulation. Im Fall von Tec1 liegt eine

positive Autoregulation vor, mit der in der Regel eine verlangsamte Reaktionszeit des genetischen Regelkreises einhergeht (Maeda and Sano, 2006; Alon, 2007).

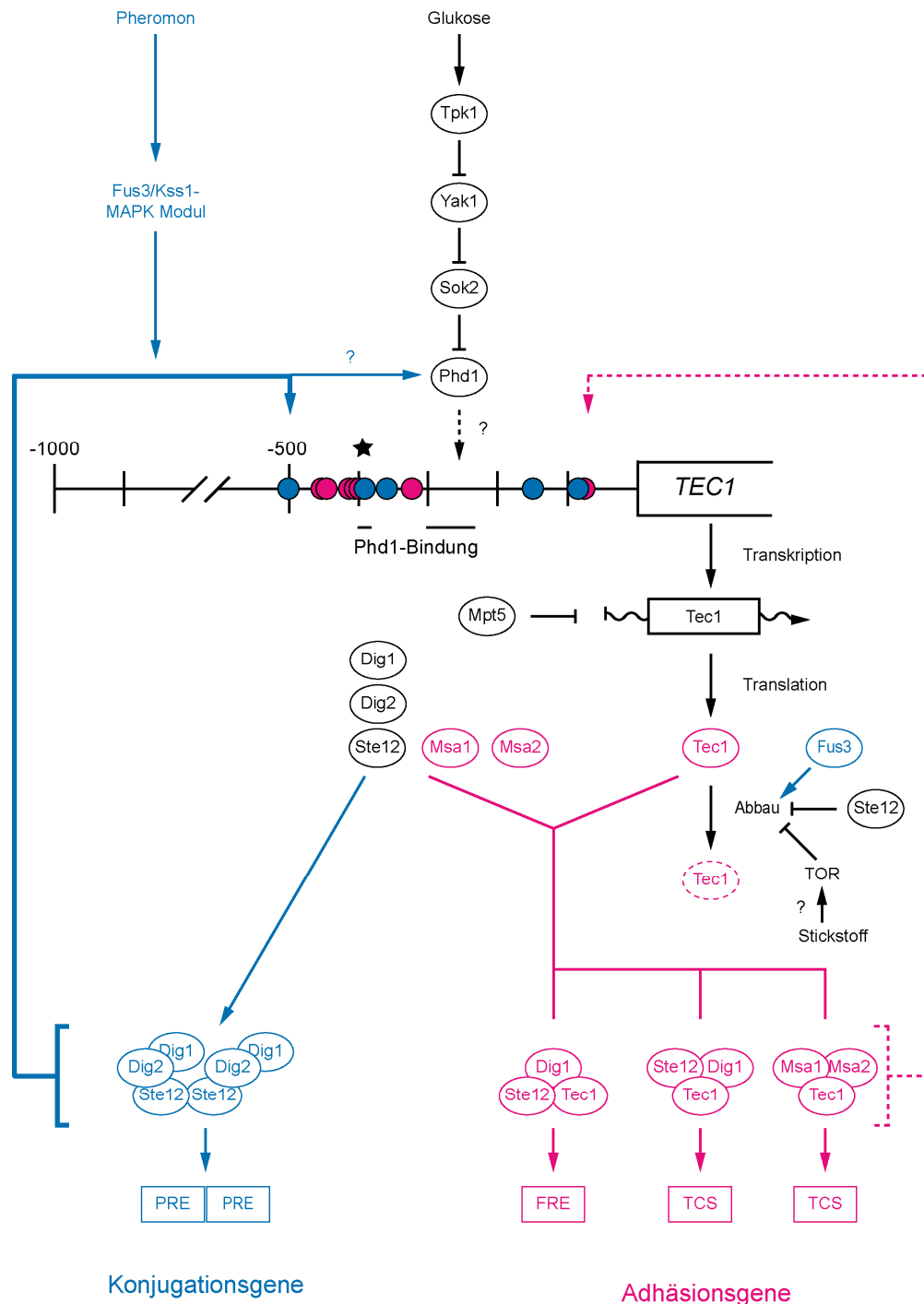


Abb. 34: Modell der Tec1-Regulation.

Der Transkriptionsfaktor Tec1 wird auf transkriptioneller Ebene unter vegetativen und Konjugationsbedingungen durch den PRE-vermittelten Regelkreis kontrolliert. Die Funktion des TCS-vermittelten autoregulatorischen Regelkreises ist noch ungeklärt. Glukosesignale werden möglicherweise über den cAMP/PKA-Signalweg integriert. Die Translation der *TEC1*-mRNA wird vermutlich über die Bindung von Mpt5 an den 3'-UTR negativ reguliert. Die Stabilität von Tec1 wird unter Konjugationsbedingungen sowie durch Nährstoffe über das Fus3/Kss1-MAPK Modul und den TOR-Signalweg beeinflusst.

Dies kann dadurch erklärt werden, dass zu Beginn nur niedrige Mengen des Transkriptionsfaktors vorliegen und erst ein spezifischer Schwellenwert erreicht werden muss, welcher eine effiziente Expression des Transkriptionsfaktors ermöglicht. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit keine Bedingung gefunden werden, unter der eine Autoregulation von *TEC1* erfolgt. Während die Autoregulation in *S. cerevisiae* lediglich einen sehr geringen Anteil der Netzwerkmodule ausmacht, wird ein Großteil der Transkriptionsfaktoren in *E. coli* autoregulatorisch kontrolliert (Thieffry et al., 1998; Lee et al., 2002). In einigen wenigen Fällen konnte sogar eine positive und eine negative Autoregulation für einen Transkriptionsfaktor beobachtet werden. Beispielsweise kann das cAMP-Rezeptor-Protein (CRP) seine Transkription sowohl aktivieren, als auch reprimieren indem es an unterschiedlichen Bindestellen in seinem Promotor bindet (Ishizuka et al., 1994).

Ein weiteres Muster, das sich in Transkriptionsnetzwerken findet, ist das „Dense Overlapping Regulon“, welches auch als „Multi-Input“-Motiv bezeichnet wird. Es besteht aus mehreren Transkriptionsfaktoren, welche kombinatorisch ihre Zielgene kontrollieren (Shen-Orr et al., 2002; Alon, 2007). Die Interaktion von Tec1 mit Ste12 bei der Regulation Adhäsions-spezifischer Gene könnte, gemeinsam mit den anderen, an der Regulation der Adhäsion beteiligten Transkriptionsfaktoren, ein „Multi-Input“-Motiv darstellen. Auch in *E. coli* finden sich mehrere „Multi-Input“-Motive wie beispielsweise bei der Kontrolle der stationären Phase (Hengge-Aronis, 1993; Shen-Orr et al., 2002).

Bei der Regulation von *TEC1* durch Ste12 und Phd1 findet sich ein weiteres Netzwerkmotiv: Die „Feedforward“-Schleife. Charakteristisch für eine „Feedforward“-Schleife ist die Regulation eines Zielgens (*TEC1*) durch zwei Transkriptionsfaktoren (Ste12 und Phd1), wobei einer der beiden Transkriptionsfaktoren (Ste12) zusätzlich den anderen Transkriptionsfaktor (Phd1) reguliert (Shen-Orr et al., 2002; Lee et al., 2002; Alon, 2007). Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine sogenannte kohärente Typ I „Feedforward“-Schleife, bei welcher sowohl das Zielgen, als auch der Transkriptionsfaktor positiv reguliert werden. Die „Feedforward“-Schleife findet sich beispielsweise auch in *E. coli* bei der Kontrolle der L-Arabinose-Aufnahme (Schleif, 2000; Shen-Orr et al., 2002) und in embryonalen Stammzellen bei der Kontrolle der Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Boyer et al., 2005).

Hier konnten nun neue Erkenntnisse über die Dynamik des TCS- und PRE-vermittelten Regelkreises unter verschiedenen Umwelteinflüssen gewonnen werden. Die basale und Pheromon-induzierte Expression von *TEC1* wird durch Ste12 und die im *TEC1*-Promotor enthaltenen PREs vermittelt und die Nährstoff-abhängige Expression wird durch verschiedene Signalwege reguliert (Abb. 34). Bislang wurde auf transkriptioneller Ebene für *TEC1* nur eine

Regulation durch das Fus3/Kss1-MAPK Modul gezeigt (Madhani and Fink, 1997; Oehlen and Cross, 1998). Diese Arbeit liefert einen Hinweis, dass *TEC1* unter Glukose- und möglicherweise auch Stickstoffmangel durch einen anderen Signalweg reguliert wird. Diese Regulation geschieht vermutlich über den cAMP/PKA-Signalweg. Ein Eingreifen des cAMP/PKA-Signalweg in die Signalweiterleitung des Fus3/Kss1-MAPK Moduls wurde bereits beschrieben und ein Bereich des *TEC1*-Promotors wird durch Phd1 gebunden (Mösch et al., 1996; Borneman et al., 2006; Zhu et al., 2009; Rhee and Pugh, 2011). Somit scheinen diese beiden Signalwege bei der Regulation des zellulären Differenzierungsprograms Adhäsion miteinander verschaltet zu sein und bilden vermutlich weitere Netzwerk motive, wie beispielsweise eine „Feedforward“-Schleife, über welche die Expression von *TEC1* durch Ste12 und Phd1 reguliert wird.

4 Material

4.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen CARL ROTH GMBH & CO. KG, SIGMA ALDRICH CHEMIE GMBH und ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH bezogen. Die Enzyme stammten von LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., ehemals FERMENTAS GMBH), NEW ENGLAND BIOLABS INC. und ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH. Die Gebrauchsmaterialien stammen von SARSTEDT AG & CO., VWR INTERNATIONAL GMBH und BIO-RAD LABORATORIES GMBH.

4.2 Enzyme, Größenstandards, Kits und Sonstiges

Tab. 1: Verwendete Enzyme, Reagenzien, Kits und Sonstiges.

Bezeichnung	Bezugsquelle
„Amersham™ Megaprime DNA Labelling System“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
„Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Blotting Membrane“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
Amylose Resin	NEW ENGLAND BIOLABS INC.
„Blotting Paper“	VWR INTERNATIONAL GMBH
„CDP-Star Reagent“	NEW ENGLAND BIOLABS INC.
„Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten ohne EDTA“	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH
DNaseI	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)
„E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit“	OMEGA BIO-TEK INC.
„E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit“	OMEGA BIO-TEK INC.
„GeneRuler™ DNA Ladder Mix“	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)
„Hybond™-N“ Nylon Membran	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
„iScript™ cDNA Synthesis Kit“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
„iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
KOD DNA Polymerase	NOVAGEN
„MobiSpin S-200“-Säule	MOBITEC GMBH
„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)

Bezeichnung	Bezugsquelle
„PCR DIG Labeling Mix“	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH
Pfu DNA Polymerase	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)
„Phusion High-Fidelity“ Polymerase	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)
„QIAprep Spin Miniprep Kit“	QIAGEN GMBH
„QIAquick Gel Extraction Kit“	QIAGEN GMBH
RNase A	CARL ROTH GMBH & CO. KG
„Roti®-Nylon Plus“ Membran	CARL ROTH GMBH & CO. KG
„Storage Phosphor Cassette“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
T4-DNA-Ligase	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH
Taq DNA Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS INC.

4.3 Auftragsarbeiten

Sequenzierungen wurden von SEQLAB-SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GMBH durchgeführt. Synthetische Oligonukleotide wurden von METABION INTERNATIONAL AG und MICROSYNTH AG und die synthetischen Promotorfragmente von LIFE TECHNOLOGIES GMBH hergestellt.

4.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Alkalischer Lysepuffer	1,85 M NaOH 7,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	Western-Analyse
„Binding“ Puffer (10 \times)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 1 mM EDTA	EMSA
„CDP-Star“-Lösung	1 \times „CDP-Star“ Verdünnungspuffer 50 μ l „CDP-Star“-Reagenz	Southern-Analyse
Coomassie Brilliant Blau-Lösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % Coomassie Brilliant Blau	Coomassiefärbung von SDS Gelen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
„Cross“-RNA-Puffer I	0,3 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 0,2 % (w/v) SDS	RNA Isolierung
„Cross“-RNA-Puffer II	1 × TE 0,2 % (w/v) SDS	Northern-Analyse
DIG1-Puffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen	Southern-Analyse
DIG2-Puffer	1 × DIG1-Puffer 1 % (w/v) Blockierungsreagenz	Southern-Analyse
DIG-Waschpuffer	1 × DIG1-Puffer 0,3 % (v/v) Tween® 20	Southern-Analyse
DNA-Auftragspuffer (6 ×)	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xylencyanolblau 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA, pH 8,0	Agarosegelelektrophorese von DNA
ECL-Lösung I	2,5 mM Luminol 0,4 mM Paracumarsäure 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western-Analyse
ECL-Lösung II	5,4 mM H ₂ O ₂ 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western-Analyse
Elektrophorese-puffer (10 ×)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS	Western-Analyse
Entfärbelösung	50 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassiefärbung von SDS Gelen
Harnstoffpuffer	5 % (w/v) SDS 8 M Harnstoff 200 mM Natriumphosphatpuffer 0,1 mM EDTA 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 M DTT (frisch zugeben)	Western-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerin 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 1 mM EDTA	EMSA
Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>
Lösung II	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>
Lösung III	5 M Kaliumacetat 11,5 % (v/v) Essigsäure	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>
„Lower Tris“ (4 ×)	1,5 M Tris-Base 8 mM EDTA 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8 mit HCl einstellen	Western-Analyse
Lyse-Lösung	2 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>
Methylenblau-Lösung	0,04 % (w/v) Methylenblau 0,5 M Natriumacetat pH 5,5 mit HCl einstellen	Northern-Analyse
MOPS-Puffer (10 ×)	200 mM MOPS 80 mM Natriumacetat 10 mM EDTA	Northern-Analyse
Natriumphosphat-puffer (1 M)	577 mM Na ₂ HPO ₄ 423 mM NaH ₂ PO ₄	Southern-Analyse
Northern-Hybridisierungs-puffer	50 mM Natriumphosphatpuffer 50 mM Pipes 100 mM NaCl 1 mM EDTA 5 % (w/v) SDS pH 7,0 mit NaOH einstellen	Northern-Analyse
Northern-Stripping-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,2 % (w/v) SDS	Northern-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Northern-Waschpuffer	1 × SSC-Puffer 0,1 % (w/v) SDS	Northern-Analyse
PEG-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 40 % (w/v) PEG 4000	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen
Pfu-Puffer (10 ×)	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 1 % (v/v) Triton X-100 0,015 mM BSA	PCR
Ponceau-Lösung	3 % (w/v) TCA 0,2 % (w/v) Ponceau S	Western-Analyse
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 4H ₂ O 30 mM Kaliumacetat, pH 7,5 10 mM CaCl ₂ 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen
RF2-Lösung	10 mM RbCl 10 mM MOPS, pH 6,8 75 mM CaCl ₂ 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin pH 6,8 mit NaOH einstellen	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen
RNA-Auftragspuffer (6 ×)	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,15 % (w/v) Orange G 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA, pH 8,0	Agarosegelelektrophorese von RNA
RNA-Ladepuffer	1 × MOPS 50 % (v/v) Glycerin 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 0,5 % (w/v) Xylencyanolblau	Northern-Analyse
SSC-Puffer (10 ×)	1,5 M NaCl 150 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0 mit HCl einstellen	Northern-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
SM-Puffer (10 ×)	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM KCl 40 mM MgSO ₄ 1 % (v/v) Triton X-100 0,015 mM BSA	PCR
SORB-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 1 M Sorbitol pH 8,0 mit Essigsäure einstellen	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen
Southern-Hybridisierungspuffer	0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7,0 % (w/v) SDS	Southern-Analyse
Southern-Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 % (w/v) SDS	Southern-Analyse
Ste12-Bindepuffer	150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7,5	Affinitätschromatographie von Proteinen
„Strip“-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 0,1 M β-Mercaptoethanol	Western-Analyse
TAE-Puffer (1 ×)	40 mM Tris-Acetat 20 mM Natriumacetat 2 mM EDTA, pH 8,0 pH 8,3 mit NaOH einstellen	Agarosegelelektrophorese
TBE-Puffer (10 ×)	1 M Tris-Base 1 M Borsäure 25 mM EDTA	Agarosegelelektrophorese, EMSA
TBS-Puffer (10 ×)	200 mM Tris-Base 1,4 M NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen	Western-Analyse
TBS-T-Puffer	1 × TBS-Puffer 0,1 % (v/v) Tween® 20	Western-Analyse
TE-Puffer (1 ×)	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	DNA/RNA Isolierung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Tec1-Bindepuffer	500 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7,5	Affinitätschromatographie von Proteinen
Transferpuffer (10 ×)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin	Western-Analyse
„Upper Tris“ (4 ×)	0,5 M Tris-Base 8 mM EDTA, pH 8,0 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8 mit HCl einstellen	Western-Analyse

4.5 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und Stammlösungen zur Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* sind in Tab. 3 aufgeführt. Die entsprechenden Festmedien enthielten 2 % (w/v) Agar. Für die Herstellung von SLAD Festmedium wurde der Agar vor dem Autoklavieren zweimal gewaschen. Kohlenstoffquellen wurden separat autoklaviert und Aminosäuren wie L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil sowie 5-FOA wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren dem entsprechenden Medium zugegeben. LFM-Medium wurde ebenfalls steril filtriert.

Tab. 3: Verwendete Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Aminosäuremischung	2 g	Jeder Standard-L-Aminosäure außer L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil
LB-Medium („Lysogeny Broth“)	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl
LFM („Low Fluorescence Medium“)	10 % (v/v) 0,1 % (v/v) 0,1 % (v/v) 2 % (w/v)	Salzstammlösung Vitaminstammlösung Spurenelementestammlösung Glukose

Bezeichnung	Zusammensetzung	
SC-4-Medium („Synthetic Complete“ ohne L-Histidin, L-Leucin, L- Tryptophan und Uracil)	0,15 % (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)
	0,5 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	0,2 mM	myo-Inositol
	0,2 % (w/v)	Aminosäuremischung
	2 % (w/v)	Glukose
Salzstammlösung	5 % (w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄
	1 % (w/v)	KH ₂ PO ₄
	0,5 % (w/v)	MgSO ₄
	0,1 % (w/v)	NaCl
	0,1 % (w/v)	CaCl ₂
SLAD-Medium („Synthetic Low Ammonia Dextrose“)	0,17 % (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)
	0,05 mM	Ammoniumsulfat
	2 % (w/v)	Glukose
SOC-Medium („Super Optimal Broth with Catabolite Repression“)	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose
Spurenelementestammlösung	0,05 % (w/v)	H ₃ BO ₄
	0,004 % (w/v)	CuSO ₄
	0,01 % (w/v)	KI
	0,02 % (w/v)	FeCl ₃
	0,04 % (w/v)	MnSO ₄
	0,02 % (w/v)	Na ₂ MoO ₄
	0,04 % (w/v)	ZnSO ₄
Vitaminstammlösung	0,0002 % (w/v)	Biotin
	0,04 % (w/v)	Calciumpantothenat
	0,2 % (w/v)	Inositol
	0,04 % (w/v)	Niacin
	0,02 % (w/v)	Para-Aminobenzoesäure
	0,04 % (w/v)	Pyroxidin-HCl
	0,04 % (w/v)	Thiamin-HCl

Bezeichnung	Zusammensetzung	
YEPD-Medium („Yeast Extract, Peptone, Dextrose“)	2 % (w/v)	Pepton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Glukose
YEPG-Medium („Yeast Extract, Peptone, Galactose“)	2 % (w/v)	Pepton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Galaktose
YNB-Medium („Yeast Nitrogen Base“)	0,15 % (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)
	0,5 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	0,2 mM	myo-Inositol
	2 % (w/v)	Glukose

4.6 Antibiotika

Die jeweiligen Stammlösungen wurden mit Wasser angesetzt und entsprechende Mengen den auf 60 °C abgekühlten Nährmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die Doxyzyklin-Stammlösung wurde mit 50 % Ethanol angesetzt und Festmedien wurden direkt vor der Verwendung supplementiert.

Tab. 4: Verwendete Antibiotika.

Bezeichnung	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	CARL ROTH GMBH & CO. KG
Doxyzyklin	20 mg/ml	50 µg/ml	SIGMA ALDRICH CHEMIE GMBH
Hygromycin B	50 mg/ml	300 µg/ml	CARL ROTH GMBH & CO. KG

4.7 Verwendete Antikörper

Die Antikörperlösungen wurden frisch in 1 × TBS-T Puffer mit 3 oder 4 % (w/v) Milchpulver angesetzt und für die Western-Analyse verwendet. Der Schaf-anti-Digoxigenin-AP Antikörper wurde frisch in DIG2-Puffer angesetzt und für die Southern-Analyse verwendet.

Tab. 5: Verwendete Primärantikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-anti-Tec1 N-Terminus (polyklonal)	1:5.000	eigene Herstellung; (Heise et al., 2010)
Kaninchen-anti- α -Tubulin (monoklonal)	1:20.000	ab184970; ABCAM

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus-anti- α -Tubulin (monoklonal)	1:1.000	CP06; MERCK KGAA
Schaf-anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment	1:10.000	11093274910; ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH

Tab. 6: Verwendete Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen (Peroxidase-gekoppelt)	1:5.000	sc-2054; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC.
Ziege-anti-Maus (polyklonal; Peroxidase-gekoppelt)	1:2.500	115-035-003; DIANOVA GMBH

4.8 Verwendete Stämme und Plasmide

4.8.1 *E. coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21-Gold (DE3)	B F ⁻ <i>dcm</i> ⁺ <i>Hte ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Tet ^r	AGILENT TECHNOLOGIES INC.
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	LIFE TECHNOLOGIES GMBH
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	LIFE TECHNOLOGIES GMBH

4.8.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tab. 8 aufgeführt und stammen, wenn nicht anders angegeben, aus der Σ 1278b Serie.

Tab. 8: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM0069	<i>S288c, MATa, his1</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0070	<i>S288c, MATa, his1</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0216	<i>MATa, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0271	<i>MATa, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG</i>	(Köhler et al., 2002)
YHUM0610	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG</i>	(Köhler et al., 2002)
YHUM0639	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, ste12Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG</i>	(Köhler et al., 2002)
YHUM0680	<i>MATa, ste12Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG</i>	(Köhler et al., 2002)
YHUM0783	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG</i>	(Köhler et al., 2002)
YHUM0909	<i>MATa, ura3-52</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0963	<i>MATa/α, flo11Δ::kanR/flo11Δ::kanR, ura3-52/ura3-52, trp1::hisG/TRP1</i>	(Braus et al., 2003)
YHUM1107	<i>MATa, ste7Δ::kanMX4, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG,</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1692	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, ste12Δ::TRP1, P_{TEC1}-TEC1::LEU2, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1694	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, P_{TEC1}-TEC1::LEU2, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG</i>	(Heise et al., 2010)
YHUM1950	<i>MATa, TEC1-YFP::HIS5, 2 x TCS-CYC1-CFP*-ADH1(T)::LEU2, ura3-52, his3::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1951	<i>MATa, STE12-YFP::HIS5, 2 x TCS-CYC1-CFP*-ADH1(T)::LEU2, ura3-52, his3::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1953	<i>MATa, TEC1-YFP::HIS5, P_{FUS1}-CFP*-ADH1(T)::LEU2, P_{FUS1}-RFP*-ADH1(T)::LEU2</i>	Stammsammlung AG Mösch

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2199	YHUM1950 mit <i>ste7Δ::hphNT1</i> Für die Deletion des <i>STE7</i> Gens wurde mit den Oligonukleotiden <i>STE7-S1</i> und <i>STE7-S2</i> , deren 5' Enden ca. 45 bp lange homologe Bereiche zu den flankierenden Bereichen des <i>STE7</i> Gens besitzen, eine <i>hphNT1</i> -Deletionskassette aus pKS133 amplifiziert und über homologe Rekombination integriert.	diese Arbeit
YHUM2201	YHUM0610 mit $P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1::LEU2}$ BHUM2053 ($P_{TEC1-TCS-PRE-TEC1::LEU2}$) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2202	YHUM0610 mit $P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1::LEU2}$ BHUM2054 ($P_{TEC1-tcs-PRE-TEC1::LEU2}$) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2203	YHUM0610 mit $P_{TEC1-TCS-pre-TEC1::LEU2}$ BHUM2055 ($P_{TEC1-TCS-pre-TEC1::LEU2}$) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2204	YHUM0610 mit $P_{TEC1-tcs-pre-TEC1::LEU2}$ BHUM2056 ($P_{TEC1-tcs-pre-TEC1::LEU2}$) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2233	YHUM0610 mit $P_{TEC1-TCS-pre-tetO1-TEC1::LEU2}$ BHUM2344 ($P_{TEC1-TCS-pre-tetO1-TEC1::LEU2}$) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2236	YHUM1694 mit $P_{TEC1-TCS-PRE-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$ BHUM2427 ($P_{TEC1-TCS-PRE-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2237	YHUM1694 mit $P_{TEC1-tcs-PRE-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$ BHUM2428 ($P_{TEC1-tcs-PRE-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2238	YHUM1694 mit $P_{TEC1-tcs-pre-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$ BHUM2430 ($P_{TEC1-tcs-pre-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3}$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2239	YHUM0610 mit <i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2427 (<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2240	YHUM0610 mit <i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2428 (<i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2241	YHUM1692 mit <i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2427 (<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1692 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2242	YHUM1692 mit <i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2428 (<i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1692 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2243	YHUM0639 mit <i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2427 (<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0639 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2244	YHUM0639 mit <i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2428 (<i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0639 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2368	YHUM1694 mit <i>P_{TEC1-TCS-pre}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i> BHUM2429 (<i>P_{TEC1-ics-PRE}-CYC1-CFP*-T_{ADH}::URA3</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde überprüft.	(Garben, 2013)
YHUM2376	YHUM0610 mit <i>LEU2</i> B2438 (<i>LEU2</i>) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM0610 integriert.	diese Arbeit
YHUM2377/ YHUM2378	<i>MATa/a, tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3, leu2::hisG/LEU2, ura3-52/ura3-52, his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM0783 mit YHUM2376 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2381/ YHUM2382	<i>MATa/a</i> , <i>tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3</i> , <i>leu2::hisG/P_{TEC1-TCS-PRE}</i> <i>TEC1::LEU2</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>his3::hisG/his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM0783 mit YHUM2201 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2383/ YHUM2384	<i>MATa/a</i> , <i>tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3</i> , <i>leu2::hisG/P_{TEC1-tcs-PRE}</i> <i>TEC1::LEU2</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>his3::hisG/his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM0783 mit YHUM2202 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2385/ YHUM2386	<i>MATa/a</i> , <i>tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3</i> , <i>leu2::hisG/P_{TEC1-TCS-pre}</i> <i>TEC1::LEU2</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>his3::hisG/his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM0783 mit YHUM2203 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2387/ YHUM2388	<i>MATa/a</i> , <i>tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3</i> , <i>leu2::hisG/P_{TEC1-tcs-pre}</i> <i>TEC1::LEU2</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>his3::hisG/his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM0783 mit YHUM2204 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2415/ YHUM2416	YHUM2376 mit <i>TRP1</i> B2441 (<i>TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2376 integriert.	diese Arbeit
YHUM2417/ YHUM2418	YHUM2201 mit <i>TRP1</i> B2441 (<i>TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2201 integriert.	diese Arbeit
YHUM2419/ YHUM2420	YHUM2202 mit <i>TRP1</i> B2441 (<i>TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2202 integriert.	diese Arbeit
YHUM2421/ YHUM2422	YHUM2203 mit <i>TRP1</i> B2441 (<i>TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2203 integriert.	diese Arbeit
YHUM2423/ YHUM2424	YHUM2204 mit <i>TRP1</i> B2441 (<i>TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2204 integriert.	diese Arbeit
YHUM2425/ YHUM2426	YHUM0610 mit <i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i> BHUM2835 (<i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2429/ YHUM2430	YHUM2201 mit <i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i> BHUM2835 (<i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2201 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2431/ YHUM2432	YHUM2203 mit <i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i> BHUM2835 (<i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2203 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2433/ YHUM2434	YHUM2233 mit <i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i> BHUM2835 (<i>P_{CMV}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2233 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2435/ YHUM2436	YHUM0610 mit <i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i> BHUM2837 (<i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2439/ YHUM2440	YHUM2201 mit <i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i> BHUM2837 (<i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2201 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2441/ YHUM2442	YHUM2203 mit <i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i> BHUM2837 (<i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2203 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2443/ YHUM2444	YHUM2233 mit <i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i> BHUM2837 (<i>P_{STE12}-rtTA::TRP1</i>) wurde mit MunI linearisiert und über homologe Rekombination am <i>TRP1</i> Locus in YHUM2233 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer <i>rtTA</i> -spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2445/ YHUM2446	<i>MATa</i> , <i>tec1Δ::HIS3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3::hisG</i> , <i>leu2::hisG</i> , <i>trp1::hisG</i> Im Stamm YHUM0610 wurde durch Expression der HO-Endonuklease von BHUM1159 ein Geschlechtstypwechsel durchgeführt. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2449/ YHUM2450	<i>MATa</i> , <i>tec1Δ::HIS3</i> , <i>P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1::LEU2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG</i> Im Stamm YHUM2201 wurde durch Expression der HO-Endonuklease von BHUM1159 ein Geschlechtstypwechsel durchgeführt. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2451/ YHUM2452	<i>MATα, tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1::LEU2, ura3-52,</i> <i>his3::hisG, trp1::hisG</i> Im Stamm YHUM2202 wurde durch Expression der HO-Endonuklease von BHUM1159 ein Geschlechtstypwechsel durchgeführt. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2453/ YHUM2454	<i>MATα, tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1::LEU2, ura3-52,</i> <i>his3::hisG, trp1::hisG</i> Im Stamm YHUM2203 wurde durch Expression der HO-Endonuklease von BHUM1159 ein Geschlechtstypwechsel durchgeführt. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2455/ YHUM2456	<i>MATα, tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1::LEU2, ura3-52,</i> <i>his3::hisG, trp1::hisG</i> Im Stamm YHUM2204 wurde durch Expression der HO-Endonuklease von BHUM1159 ein Geschlechtstypwechsel durchgeführt. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2457/ YHUM2458	YHUM2445/YHUM2446 mit <i>LEU2</i> B2438 (<i>LEU2</i>) wurde mit BstEII linearisiert und über homologe Rekombination am <i>LEU2</i> Locus in YHUM2445/YHUM2446 integriert.	diese Arbeit
YHUM2463/ YHUM2464	<i>MATα/a, tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-TCS-PRE}-</i> <i>TEC1::LEU2/P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1::LEU2, ura3-52/ura3-52,</i> <i>his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM2449/YHUM2450 mit YHUM2417 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2465/ YHUM2466	<i>MATα/a, tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-tcs-PRE}-</i> <i>TEC1::LEU2/P_{TEC1-tcs-PRE}-TEC1::LEU2, ura3-52/ura3-52,</i> <i>his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM2451/YHUM2452 mit YHUM2419 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2467/ YHUM2468	<i>MATα/a, tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-TCS-pre}-</i> <i>TEC1::LEU2/P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1::LEU2, ura3-52/ura3-52,</i> <i>his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM2453/YHUM2454 mit YHUM2421 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2469/ YHUM2470	<i>MATα/a, tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3, P_{TEC1-tcs-pre}-</i> <i>TEC1::LEU2/P_{TEC1-tcs-pre}-TEC1::LEU2, ura3-52/ura3-52,</i> <i>his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM2455/YHUM2456 mit YHUM2423 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2471/ YHUM2472	<i>MATa/a</i> , <i>tec1Δ::HIS3/tec1Δ::HIS3</i> , <i>LEU2/LEU2</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>his3::hisG/his3::hisG</i> , <i>trp1::hisG/TRP1</i> Diploider Stamm, der durch Kreuzen von YHUM2457/YHUM2458 mit YHUM2415 entstanden ist. Der Geschlechtstyp wurde mittels Paarungstest überprüft.	diese Arbeit
YHUM2483	<i>MATa</i> , <i>P_{FUS1}-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::LEU2</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM2504/ YHUM2505	YHUM1694 mit <i>P_{TEC1-TCS-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2892 (<i>P_{TEC1-TCS-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	
YHUM2506/ YHUM2507	YHUM1694 mit <i>P_{TEC1-tcs-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2893 (<i>P_{TEC1-tcs-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	
YHUM2508/ YHUM2509	YHUM1694 mit <i>P_{TEC1-TCS-pre-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2894 (<i>P_{TEC1-TCS-pre-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	
YHUM2510/ YHUM2511	YHUM1694 mit <i>P_{TEC1-tcs-pre-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2895 (<i>P_{TEC1-tcs-pre-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM1694 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	
YHUM2512/ YHUM2513	YHUM0610 mit <i>P_{TEC1-TCS-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2892 (<i>P_{TEC1-TCS-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	
YHUM2514/ YHUM2515	YHUM0610 mit <i>P_{TEC1-tcs-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>	diese Arbeit
	BHUM2893 (<i>P_{TEC1-tcs-PRE-3 × mTurquoise 2*-ADH1(T)::URA3}</i>) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am <i>URA3</i> Locus in YHUM0610 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP-spezifischen Sonde überprüft.	

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2516/ YHUM2517	YHUM1692 mit $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ - $ADH1(T)::URA3$ BHUM2892 ($P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*-ADH1(T)::URA3$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am $URA3$ Locus in YHUM1692 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP- spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2518/ YHUM2519	YHUM1692 mit $P_{TEC1-ics-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ - $ADH1(T)::URA3$ BHUM2893 ($P_{TEC1-ics-PRE-3} \times mTurquoise 2^*-ADH1(T)::URA3$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am $URA3$ Locus in YHUM1692 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP- spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2520/ YHUM2521	YHUM0639 mit $P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ - $ADH1(T)::URA3$ BHUM2892 ($P_{TEC1-TCS-PRE-3} \times mTurquoise 2^*-ADH1(T)::URA3$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am $URA3$ Locus in YHUM0639 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP- spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit
YHUM2522/ YHUM2523	YHUM0639 mit $P_{TEC1-ics-PRE-3} \times mTurquoise 2^*$ - $ADH1(T)::URA3$ BHUM2893 ($P_{TEC1-ics-PRE-3} \times mTurquoise 2^*-ADH1(T)::URA3$) wurde mit EcoRV linearisiert und über homologe Rekombination am $URA3$ Locus in YHUM0639 integriert. Die korrekte Integration wurde mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung einer CFP- spezifischen Sonde überprüft.	diese Arbeit

4.8.3 Plasmide

Tab. 9: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
B2338 (pRS202)	$URA3$, Amp^R , $2 \mu m$	pRS202	(Connelly and Hieter, 1996)
B2438 (YIplac128)	$LEU2$, Amp^R , integrativer Vektor	YIplac128	(Gietz and Sugino, 1988)
B2439 (YCplac111)	$LEU2$, Amp^R , CEN	YCplac111	(Gietz and Sugino, 1988)
B2441 (YIplac204)	$TRP1$, Amp^R , integrativer Vektor	YIplac204	(Gietz and Sugino, 1988)
B2442 (YCplac22)	$TRP1$, Amp^R , CEN	YCplac22	(Gietz and Sugino, 1988)
B2444 (YIplac211)	$URA3$, Amp^R , integrativer Vektor	YIplac211	(Gietz and Sugino, 1988)

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
B2445 (YCplac33)	<i>URA3, Amp^R, CEN</i>	YCplac33	(Gietz and Sugino, 1988)
B2797 (pRS413)	<i>HIS3, Amp^R, CEN</i>	pRS413	(Sikorski and Hieter, 1989)
B3445 (pMAL-c2)	Plasmid für die Expression von MBP Fusionsproteinen	pMAL-c2	NEW ENGLAND BIOLABS INC.
BHUM0030	<i>P_{TEC1}-TEC1, URA3, Amp^R, 2 μm</i>	pRS202	(Mösch and Fink, 1997)
BHUM0388	<i>MBP-TEC1-FLAG, Amp^R</i>	pMAL-c2	(Madhani and Fink, 1997)
BHUM0389	<i>MBP-STE12-FLAG, Amp^R</i>	pMAL-c2	(Madhani and Fink, 1997)
BHUM1159	<i>P_{GAL}-HO, URA3, Amp^R, CEN</i>		(Herskowitz and Jensen, 1991)
BHUM1424	<i>DON1^{U. maydis}, Amp^R</i> Eco47IR-basierter Suizidvektor	pJET1.2	LIFE TECHNOLOGIES GMBH
BHUM1616	<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i>	YIplac128	(Heise et al., 2010)
BHUM1721	<i>FRE-P_{CYC1}-UbiY-Δk-CFP-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i>	YIplac211	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1815 (pCM252)	<i>P_{CMV}-rtTA-T_{ADH}-tetO-Box-Polylinker-T_{CYC1}, TRP1, Amp^R, CEN</i>	YCplac22	(Bellí et al., 1998)
BHUM2022	<i>BglII-P_{TEC-tcs-PRE}-SalI, Amp^R</i> Ein Teil des <i>TEC1</i> Promotors (–1 bis –579), mit mutierten TCS-Elementen, wurde durch LIFE TECHNOLOGIES GMBH synthetisiert. Am 5' Ende des Fragments befindet sich eine BglII Schnittstelle und am 3' Ende ein ATG gefolgt von einer SalI Schnittstelle. Das Fragment wurde vom Hersteller pMA-T kloniert.	pMA-T	diese Arbeit
BHUM2023	<i>BglII-P_{TEC-TCS-pre}-SalI, Amp^R</i> Ein Teil des <i>TEC1</i> Promotors (–1 bis –579), mit mutierten PREs, wurde durch LIFE TECHNOLOGIES GMBH synthetisiert. Am 5' Ende des Fragments befindet sich eine BglII Schnittstelle und am 3' Ende ein ATG gefolgt von einer SalI Schnittstelle. Das Fragment wurde vom Hersteller pMA-T kloniert.	pMA-T	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM2024	<i>BglIII-P_{TEC-ics-pre}-SalI, Amp^R</i> Ein Teil des <i>TEC1</i> Promotors (–1 bis –579), mit mutierten TCS- und PRE-Elementen, wurde durch LIFE TECHNOLOGIES GMBH synthetisiert. Am 5' Ende des Fragments befindet sich eine <i>BglIII</i> Schnittstelle und am 3' Ende ein ATG gefolgt von einer <i>SalI</i> Schnittstelle. Das Fragment wurde vom Hersteller pMA-T kloniert.	pMA-T	diese Arbeit
BHUM2053	<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i> In BHUM1616 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern <i>TEC1(P)-BglIII-fw</i> und <i>TEC1(P)-BglIII-rev</i> an Position –581 des <i>TEC1</i> Promotors das C durch ein T ersetzt, um eine <i>BglIII</i> Schnittstelle zu generieren.	YIplac128	diese Arbeit
BHUM2054	<i>P_{TEC1-ics-PRE}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i> Das <i>BglIII-P_{TEC-ics-pre}-SalI</i> Fragment wurde durch Restriktion mit <i>BglIII</i> und <i>SalI</i> aus BHUM2022 geschnitten und in <i>BglIII/SalI</i> geschnittenes BHUM2053 ligiert.	YIplac128	diese Arbeit
BHUM2055	<i>P_{TEC1-TCS-pre}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i> Das <i>BglIII-P_{TEC-TCS-pre}-SalI</i> Fragment wurde durch Restriktion mit <i>BglIII</i> und <i>SalI</i> aus BHUM2023 geschnitten und in <i>BglIII/SalI</i> geschnittenes BHUM2053 ligiert.	YIplac128	diese Arbeit
BHUM2056	<i>P_{TEC1-ics-pre}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i> Das <i>BglIII-P_{TEC-ics-pre}-SalI</i> Fragment wurde durch Restriktion mit <i>BglIII</i> und <i>SalI</i> aus BHUM2024 geschnitten und in <i>BglIII/SalI</i> geschnittenes BHUM2053 ligiert.	YIplac128	diese Arbeit
BHUM2308	<i>BglIII-P_{TEC-TCS-pre-tetO1}-SalI, Amp^R</i> Ein Teil des <i>TEC1</i> Promotors (–1 bis –579) wurde durch LIFE TECHNOLOGIES GMBH synthetisiert. In diesem Promotor-Fragment sind die PRE-Elemente mutiert und in das PRE an Position –153 bis –159 wurde eine <i>tet</i> Operatorsequenz (TCCCTATCAGTGATAGAGA) inseriert. Am 5' Ende des Fragments befindet sich eine <i>BglIII</i> Schnittstelle und am 3' Ende ein ATG gefolgt von einer <i>SalI</i> Schnittstelle. Das Fragment wurde vom Hersteller pMA-T kloniert.	pMA-T	diese Arbeit
BHUM2344	<i>P_{TEC1-TCS-pre-tetO1}-TEC1-T_{TEC1}, LEU2, Amp^R</i> Das <i>BglIII-P_{TEC-TCS-pre-tetO1}-SalI</i> Fragment wurde durch Restriktion mit <i>BglIII</i> und <i>SalI</i> aus BHUM2308 geschnitten und in <i>BglIII/SalI</i> geschnittenes BHUM2054 ligiert.	YIplac128	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM2427	<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-UbiY-Δk-CFP-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor, inklusive der am 5' Ende gelegenen PstI Schnittstelle, des ATGs und der darauf folgenden SalI Schnittstelle, wurde mit den Oligonukleotiden TEC1(P)-Acc65I-fw und TEC1(P)-NotI-rev3 aus BHUM2053 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine Acc65I Schnittstelle und am 3' Ende eine NotI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM1721 ligiert.	YIplac211	(Garben, 2013)
BHUM2428	<i>P_{TEC1-tcs-PRE}- UbiY-Δk-CFP-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor mit den mutierten TCS-Elementen, inklusive der am 5' Ende gelegenen PstI Schnittstelle, des ATGs und der darauf folgenden SalI Schnittstelle, wurde mit den Oligonukleotiden TEC1(P)-Acc65I-fw und TEC1(P)-NotI-rev3 aus BHUM2054 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine Acc65I Schnittstelle und am 3' Ende eine NotI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM1721 ligiert.	YIplac211	(Garben, 2013)
BHUM2429	<i>P_{TEC1-TCS-pre}- UbiY-Δk-CFP-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor mit den mutierten PREs, inklusive der am 5' Ende gelegenen PstI Schnittstelle, des ATGs und der darauf folgenden SalI Schnittstelle, wurde mit den Oligonukleotiden TEC1(P)-Acc65I-fw und TEC1(P)-NotI-rev3 aus BHUM2055 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine Acc65I Schnittstelle und am 3' Ende eine NotI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM1721 ligiert.	YIplac211	(Garben, 2013)
BHUM2430	<i>P_{TEC1-tcs-pre}- UbiY-Δk-CFP-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor mit den mutierten TCS-Elementen und PREs, inklusive der am 5' Ende gelegenen PstI Schnittstelle, des ATGs und der darauf folgenden SalI Schnittstelle, wurde mit den Oligonukleotiden TEC1(P)-Acc65I-fw und TEC1(P)-NotI-rev3 aus BHUM2056 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine Acc65I Schnittstelle und am 3' Ende eine NotI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM1721 ligiert.	YIplac211	(Garben, 2013)
BHUM2832	<i>P_{STE12}</i> in pJET1.2 Der <i>STE12</i> Promotor wurde mit den Oligonukleotiden PSTE12-PstI-fw und PSTE12-XbaI-rev aus YHUM0216 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine PstI Schnittstelle und am 3' Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde „blunt-end“ in BHUM1424 (pJET1.2) ligiert.	pJET1.2	diese Arbeit
BHUM2833	<i>P_{STE12}</i> in pJET1.2 In BHUM2832 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern PSTE12-XbaIMut-fw und PSTE12-XbaIMut-rev die Sequenz TCTAGA der XbaI Schnittstelle zu TCTGGA mutiert, welche nicht mehr durch XbaI erkannt werden kann.	pJET1.2	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM2835	<i>P_{CMV}-rtTA-T_{ADH}, TRP1, Amp^R</i> Der <i>CMV</i> Promotor und der <i>rtTA</i> ORF wurden mit den Oligonukleotiden <i>rtTA</i> -PstI-fw und <i>rtTA</i> -EcoRI-rev aus BHUM1815 amplifiziert. Hierbei wurde am 5' Ende eine PstI Schnittstelle und am 3' Ende eine EcoRI Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in mit PstI und EcoRI geschnittenes B2441 ligiert.	YIplac204	diese Arbeit
BHUM2837	<i>P_{STE12}-rtTA-T_{ADH}, TRP1, Amp^R</i> Der <i>STE12</i> Promotor wurde durch Restriktion mit PstI und XbaI aus BHUM2833 geschnitten und in mit PstI und XbaI geschnittenes BHUM2835 ligiert.	YIplac204	diese Arbeit
BHUM2847	<i>FRE-P_{CYC1}-UbiY-Δk-3 × mTurquoise2-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i>	YIplac211	Stammsammlung AG Mösch
BHUM2892	<i>P_{TEC1-TCS-PRE}-UbiY-Δk-3 × mTurquoise2-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor wurde durch Restriktion mit Acc65I und NotI aus BHUM2427 geschnitten und in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM2847 ligiert.	YIplac211	diese Arbeit
BHUM2893	<i>P_{TEC1-tcs-PRE}-UbiY-Δk-3 × mTurquoise2-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor wurde durch Restriktion mit Acc65I und NotI aus BHUM2428 geschnitten und in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM2847 ligiert.	YIplac211	diese Arbeit
BHUM2894	<i>P_{TEC1-TCS-pre}-UbiY-Δk-3 × mTurquoise2-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor wurde durch Restriktion mit Acc65I und NotI aus BHUM2429 geschnitten und in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM2847 ligiert.	YIplac211	diese Arbeit
BHUM2895	<i>P_{TEC1-tcs-pre}-UbiY-Δk-3 × mTurquoise2-T_{ADH}, URA3, Amp^R</i> Der <i>TEC1</i> Promotor wurde durch Restriktion mit Acc65I und NotI aus BHUM2430 geschnitten und in mit Acc65I und NotI geschnittenes BHUM2847 ligiert.	YIplac211	diese Arbeit
pKS133	<i>hphNT1, Amp^R</i> Mit STE7-S1- und STE7-S2-Oligonukleotiden kann diese Kassette amplifiziert und für die Deletion von Genen verwendet werden.		Stammsammlung AG Taxis
pMA-T	<i>Amp^R</i> Vektor für synthetische Gene	pMA-T	LIFE TECHNOLOGIES GMBH

4.9 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 10 aufgeführt. Blau hervorgehobene Sequenzen zeigen hinzugefügte Restriktionsschnittstellen, rot hervorgehobene Sequenzen zeigen Nukleotide, welche zu einer Punktmutation führen.

Tab. 10: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
BHB2438-1	ATG TTG TGT GGA ATT GTG AG	Sequenzierung der <i>P_{TEC1}-CFP</i> - und <i>P_{TEC1}-3 × mTurquoise 2</i> -Reportergene sowie der <i>P_{CMV}-rtTA</i> - und <i>P_{STE12}-rtTA</i> -Konstrukte
BHB2438-2	CAC GAC GTT GTA AAA CGA C	
BHCDC42-1	GAG ACC CTT GTC ATA TCC TTC	<i>CDC42</i> -Sonde für Northern Hybridisierung
BHCDC42-2	CTT GAT AAC AGG AGG CTC CAA	
CDC28-RT-fw-743-761	GCT TTC CTC AAT GGC GCA G	Quantitative Real-Time PCR
CDC28-RT-rev-858-839	GGC GCT AAT CCG GTT AAT AG	
CFP-Sonfor	ATG CAA CAT ACG GAA AAC TTA C	<i>CFP</i> -Sonde für Southern Hybridisierung
CFP-Sonrev	GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG	
CMV(P)-seq-fw	GGA TAG CGG TTT GAC TCA CG	Sequenzierung des <i>P_{CMV}</i>
FLO11-RT-fw-3939-3958	CGT TGT CAC ATC TCC ATC TC	Quantitative Real-Time PCR
FLO11-RT-rev-4057-4037	GAA CCT TGA TAT TAG CAG CAC	
hiskantag2	GCT GCG CAC GTC AAG ACT G	Überprüfung der <i>STE7</i> -Deletion
pJET1.2_seq_fw	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC	Sequenzierung <i>P_{STE12}</i>
PSTE12-PstI-fw	GCG GCG CTG CAG ATC ACT TTC AAG CTG TAG TAT G	Amplifizierung des <i>P_{STE12}</i> , Generierung von 5' PstI- und 3' XbaI-Schnittstellen
PSTE12-XbaI-rev	CGC CGC TCT AGA GAC TTT CAT CCT TGG TGA AC	
PSTE12-XbaIMut-fw	GTA TAA ATA TAT GAA CTC TGG AGT GTT GCA TAA TTT G	Mutation der internen XbaI-Schnittstelle im <i>P_{STE12}</i>
PSTE12-XbaIMut-rev	CAA ATT ATG CAA CAC TCC AGA GTT CAT ATA TTT ATAC	
rtTA-PstI-fw	CGC CGC CTG CAG GAG CTT GGC CCA TTG CAT AC	

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
rtTA-EcoRI-rev	GCG GCG GAA TTC TTA TTA CGA TCC TCG C	Amplifizierung des P_{CMV} und des <i>rtTA</i> , Generierung von 5' PstI- und 3' EcoRI-Schnittstellen
rtTA-Son-fw	CTT GGT GTA GAG CAG CCT AC	<i>rtTA</i> -Sonde für Southern Hybridisierung
rtTA-Son-rev	TCC GGG AGA TCG AGC AGG	
STE7-S1	GAT CAT ATC TGT TTT TGC AGC GTG GTA TAT TGG TTG TTG GTC ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	Deletion von <i>STE7</i>
STE7-S2	GAA AAA AAG TGC AAT ATG TTC CTA ACT AAT GTT ATC GCA TGC ATT CAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	
STE7-KO	AAT GTA CAA TCA GAT AAT AAA CAC	Überprüfung der <i>STE7</i> -Deletion
TEC1(P)- Acc65I-fw	GCG GCG GGT ACC CTG CAG CTT ATT GTA CAC AC	Amplifizierung des P_{TEC1} , Generierung von 5' Acc65I- und 3' NotI-Schnittstellen
TEC1(P)-NotI- rev3	GCG GCG GCG GCC GCT GTC GAC CAT GGT TAA ACA GG	
TEC1(P)-BglII- fw	AGG CCA AAA TGG TGA GAT CTT TTT ACA GGA AG	Einführen einer BglII-Schnittstelle in den P_{TEC1} durch sequenzspezifische Mutagenese
TEC1(P)-BglII- rev	CTT CCT GTA AAA AGA TCT CAC CAT TTT GGC CT	
TEC1-EMSA- fw-Cy5	CCA TTT AGT GAC ACA GGT GAG	Generierung eines P_{TEC1} - Fragments mit Cy 5.5-Markierung am 5' Ende für EMSA
TEC1-EMSA- rev	CTT CTT GTC GAT ATG GGA GG	
TEC1-KO	GCT CAT GCA CAG TTA AAA AGC	Sequenzierung P_{TEC1}
TEC1Nsonfor	GTA TTC ACA GTC GGC CTT G	<i>TEC1</i> -Sonde für Northern und Southern Analyse
TEC1SEQ1	GAC TGA AGG TAG AGA GTC	
TEC1-RT-fw- 1301-1321	CTG CTG AAG ATG CTT ACA ATG	Quantitative Real-Time PCR
TEC1-RT-rev- 1391-1410	TGG AGA ATG TTC GTA ATG CTG	

4.10 Geräte

Tab. 11: Geräte.

Gerät	Hersteller
Beleuchtungseinrichtung „RB5000“	KAISER FOTOTECHNIK GMBH & CO.KG
Brutschrank „B5042“	HERAEUS HOLDING GMBH
CCD-Kamera „ORCA-ER-1394“	HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GMBH
Chemolumineszenz-Detektions-Gerät „Chemostar Professional Apparatur“	INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH
Digitalkamera „Canon PowerShot A620“	CANON DEUTSCHLAND GMBH
DNA-Geldokumentationsanlage „GelDoc XR Systems“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
DNA-Gelelektrophoreseapparaturen	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Durchlichtmikroskop „Axioskop 40“	CARL ZEISS AG
Elektroporationsgerät „Gene Pulser™“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Fluoreszenzmikroskop „AxioImager A1“	CARL ZEISS AG
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	CARL ZEISS AG
Hybridisierungssofen „HYBRID Mini 38“	H. SAUR LABORBEDARF
Kaltlichtquelle „KL 1500 LCD“	SCHOTT AG
Multivortexer „Vibrax VXR Basic“	IKA®-WERKE GMBH & CO. KG
PCR-Block „Primus 25 advanced“	VWR INTERNATIONAL GMBH (ehemals PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH)
PCR-Block „Primus 96 advanced“	VWR INTERNATIONAL GMBH (ehemals PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH)
PCR-Block „TProfessional Basic Gradient“	BIOMETRA GMBH
pH-Meter „Seven Easy“	METTLER-TOLEDO GMBH
Protein-Gelelektrophoreseapparatur „Mini- PROTEAN®3 Cell“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Protein-Gelelektrophoreseapparatur für EMSA	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Protein-Transferapparatur „Mini Transfer Electrophoretic Transfer Cell“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Real-time PCR-Block „CFX Connect™ Real- Time PCR Detection System“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Rollinkubator „Stuart® SRT1“	BIBBY SCIENTIFIC LIMITED
Rollinkubator „Stuart® SRT6“	BIBBY SCIENTIFIC LIMITED

Gerät	Hersteller
Rotationsinkubator	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Schüttelinkubator „Certomat® R“	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GMBH
Schüttelinkubator „KS-15“	EDMUND BÜHLER GMBH
Schüttelinkubator „SM-30“	EDMUND BÜHLER GMBH
Spannungsgeber „PowerPac Basic™“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Spannungsgeber „PowerPac™ HC“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Spektralphotometer „WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter“	BIOCHROM LTD.
Spektralphotometer „Ultrospec 10 Cell Density Meter“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
Spektralphotometer „ND-1000 NanoDrop®“	VWR INTERNATIONAL GMBH (ehemals PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH)
Standkühlzentrifuge „4K15“	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GMBH
Standzentrifuge „Megafuge 1.0R“	HERAEUS HOLDING GMBH
Standzentrifuge „Sorvall RC-5B Plus Superspeed“	GMI INC.
Stereomikroskop „Stemi 2000-C“	CARL ZEISS AG
„Storm 860 Phosphorimager“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
„ThermoMixer C“	EPPENDORF AG
Tischautoklav „LTA 2 × 3 × 4“	ZIRBUS TECHNOLOGY GMBH
Tischkühlzentrifuge „Biofuge fresco“	HERAEUS HOLDING GMBH
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	HERAEUS HOLDING GMBH
Ultrazentrifuge „Optima™ L-90K“	BECKMAN COULTER GMBH
UV-Strahlungsgerät „Stratalinker® UV Crosslinker 2400“	AGILENT TECHNOLOGIES INC. (ehemals STRATAGENE CORP.)
UV-Transilluminator „IL-200-M/L“	H. SAUR LABORBEDARF
Variable-Mode Imager „Typhoon Trio“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
Zellhomogenisator „French Pressure Cell Press“	AMERICAN INSTRUMENT COMPANY

4.11 Bezugsquellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte, Produkte und Programme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

ABCAM (Cambridge, GB)	LIFE TECHNOLOGIES GMBH (Darmstadt, D)
AGILENT TECHNOLOGIES INC. (Santa Clara, CA, USA)	MBI FERMENTAS GMBH (THERMO FISHER SCIENTIFC INC. Waltham, MA, USA)
AMERICAN INSTRUMENT COMPANY (Silver Spring, MD, USA)	MERCK KGAA (Darmstadt, D)
B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GMBH (Melsungen, D)	METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D)
BECKMAN COULTER GMBH (Krefeld, D)	METTLER-TOLEDO GMBH (Gießen, D)
BIBBY SCIENTIFIC LIMITED (Stone, GB)	MICROSOFT DEUTSCHLAND GMBH (Bad Homburg vor der Höhe)
BIOCHROM LTD. (Cambridge, GB)	MICROSYNTH AG (Balgach, CH)
BIOMETRA GMBH (Göttingen, D)	MOBiTEC GMBH (Göttingen, D)
BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D)	NEW ENGLAND BIOLABS INC. (Ipswich, MA, USA)
CANON DEUTSCHLAND GMBH (Krefeld, D)	NOVAGEN (MERCK KGAA, Darmstadt, D)
CARL ROTH GMBH & Co. KG (Karlsruhe, D)	OMEGA BIO-TEK INC. (Norcross, GA, USA)
CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen, D)
DIANOVA GMBH (Hamburg, D)	PERKINELMER (WALTHAM, MA, USA)
EDMUND BÜHLER GMBH (Hechingen, D)	QIAGEN GMBH (Hilden, D)
EPPENDORF AG (Hamburg, D)	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH (Grenzach-Wyhlen, D)
GE HEALTHCARE EUROPE GMBH (MÜNCHEN, D)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Dallas, TX, USA)
GENE CODES CORPORATION (Ann Arbor, MI, USA)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, D)
GMI INC. (Ramsey, MN, USA)	SCHOTT AG (Mainz, D)
H. SAUR LABORBEDARF (Reutlingen, D)	SEQLAB-SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GMBH (Göttingen, D)
HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GMBH (Herrsching am Ammersee, D)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D)
HERAEUS HOLDING GMBH (Hanau, D)	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GMBH (Osterode am Harz, D)
IKA®-WERKE GMBH & Co. KG (Staufen, D)	THERMO FISHER SCIENTIFC INC. (Waltham, MA, USA)
INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH (Göttingen, D)	VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, D)
KAISER FOTOTECHNIK GMBH & Co.KG (Buchen, D)	ZIRBUS TECHNOLOGY GMBH (Bad Grund/Harz)
KAPELAN BIO-IMAGING GMBH (Leipzig, D)	

5 Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden in LB-Medium (Tab. 3) über Nacht bei 37 °C angezogen und Festmedien enthielten 2 % (w/v) Agar. Zur Selektion auf Plasmide wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten.

Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gegen das verwendete Medium bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen pro ml (Sherman et al., 1986). Die Wachstumszeiten und Volumina wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$V_I = V_{HK} \times \frac{OD_t}{OD_p} \times e^{\mu \Delta t}$$

V_I	=	Impfvolumen (ml)	OD_p	=	OD ₆₀₀ der Vorkultur
V_{HK}	=	Volumen der Hauptkultur (ml)	μ	=	Wachstumsrate (h ⁻¹)
OD_t	=	gewünschte OD ₆₀₀ nach Zeit t	Δt	=	Wachstumszeit (h)

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 850 µl Zellsuspension mit 850 µl 30 %igem Glycerin gemischt und bei –80 °C eingefroren.

5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden in Voll- (YEPD-), synthetischem- (SC-) oder Minimal- (YNB-) Medium bei 30 °C auf einem Dreh- oder Rotationsschüttler angezogen und die entsprechenden Festmedien enthielten 2 % (w/v) Agar. *S. cerevisiae*-Stämme, die mikroskopiert werden sollten, wurden in LFM-Medium angezogen. Für die Untersuchung des Pseudohyphenwachstums wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme auf SLAD-Festmedium angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurden 2 % (w/v) Glukose, 0,1 % (w/v) Glukose oder 2 % (w/v) Galaktose verwendet. In Abhängigkeit des Stammhintergrunds wurden dem SC-, YNB- bzw. LFM-Medium die entsprechenden Aminosäuren (0,3 mM L-Histidin, 1,7 mM L-Leucin, 0,4 mM L-Tryptophan und 0,2 mM Uracil) zugesetzt. Zur Induktion der HO-Endonuklease, welche für den Wechsel des Geschlechtstyps benötigt wird, wurde das Vollmedium YEPG verwendet. Zur Selektion in Festmedien wurde 5-FOA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml verwendet.

Um den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Expression von *TEC1* und *FLO11* zu untersuchen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme zunächst über Nacht in 10 ml YNB mit 0,2 mM Uracil bei 30 °C angezogen. Am nächsten Tag wurde damit eine Hauptkultur mit einem Volumen vom 100 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30 °C in einem Erlenmeyerkolben schüttelnd inkubiert. Nach Aufteilung der Kulturen wurde jeder Stamm einerseits als Kontrolle bei 30 °C, je nach Bedingung für weitere 90 min bzw. 3 h weiter inkubiert, oder mit 1 µM α-Faktor, 0,1 M NaCl bzw. 10 mM 3-AT versetzt und ebenfalls für 90 Min (α-Faktor, NaCl) bzw. 3 h (3-AT) inkubiert. Alternativ wurden die *S. cerevisiae*-Zellen für 3 min bei 850 g zentrifugiert, mit YNB ohne Ammoniumsulfat oder YNB mit 0,1 % (w/v) Glukose gewaschen und anschließend in YNB ohne Ammoniumsulfat oder mit 0,1 % (w/v) Glukose für 3 h weiter inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 2 OD bzw. 25 ml für spätere Protein- bzw. RNA-Analysen entnommen. Um die Tec1-Proteinmenge in diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme in YNB-Medium bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und anschließend jeweils 2 OD Zellen für die Protein-Analyse entnommen.

Um die Tec1-Proteinmenge in An- und Abwesenheit von Doxzyklin zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme zunächst in SC-Medium mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin, und 0,2 mM Uracil in einer Hauptkultur mit einem Volumen von 100 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für 3 h bei 30 °C angezogen. Nach Entnahme von 2 OD Zellen für den Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen aufgeteilt und jeder Stamm wurde einerseits als Kontrolle bei 30 °C für weitere 24 h weiter inkubiert, oder mit 50 µg/µl Doxzyklin versetzt und ebenfalls für 24 h inkubiert. Nach 4 h, 6 h, 8 h und 24 h wurden jeweils 2 OD Zellen für spätere Proteinanalysen entnommen.

Um den Einfluss einer C-terminalen YFP-Markierung auf die *TEC1*-Transkript- und Tec1-Proteinmengen zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme in YNB mit 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil bis zum Erreichen der logarithmischen Phase angezogen und anschließend Proben für die RNA-und Protein-Extraktion entnommen.

Das Wachstum der *S. cerevisiae*-Zellen wurde durch die Messung der OD₆₀₀ gegen das verwendete Medium bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen pro ml (Sherman et al., 1986).

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Hefezellen zunächst 2 Tage auf YEPD-Agarplatten inkubiert und in 1,7 ml einer Mischung aus YEPD und Glycerin gelöst. Die Endkonzentration des Glycerins betrug 15 % (v/v) und die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.2 Präparation von DNA

5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse (Bimboim and Doly, 1979)

Eine Einzelkolonie von *E. coli*-Stämmen mit dem gewünschten Plasmid wurde über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 3421 g geerntet und in 100 µl Lösung I resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 200 µl der alkalischen Lösung II zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Die Neutralisierung erfolgte durch die Zugabe von 150 µl Lösung III und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 16060 g wurde das DNA-Gemisch von Zelltrümmern und denaturierten Proteinen getrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl 100 %igem (v/v) Ethanol gemischt, um die DNA zu fällen. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zentrifugieren (10 min bei 16060 g) pelletiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30 µl dH₂O gelöst und 2 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben, um noch vorhandene RNA zu degradieren. Die DNA-Lösung wurde bei –20 °C gelagert.

5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels „Plasmid Mini-Kit“

Eine Einzelkolonie von *E. coli*-Stämmen mit dem gewünschten Plasmid wurde über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden durch einminütige Zentrifugation bei 16060 g geerntet und das Plasmid mit dem „E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit“ (OMEGA BIO-TEK INC.) oder dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN GMBH) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem „ND-1000 NanoDrop®“ Spektrophotometer bestimmt. Die DNA-Lösung wurde bei –20 °C gelagert.

5.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae* (Hoffman and Winston, 1987)

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden in 10 ml YEPD-Medium über Nacht bei 30 °C angezogen und durch fünfminütige Zentrifugation bei 1912 g geerntet, in 500 µl dH₂O resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl Lyse-Lösung resuspendiert und mit 200 µl „Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur Extraktion von Nukleinsäuren“ (Verhältnis 25:24:1) und 600 mg Glasperlen (Ø 0,25 bis 0,5 mm) versetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C auf einem „Vibrax VXR Basic“ Multivortexer aufgebrochen. Die Zelltrümmer und denaturierten Proteine wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 16060 g abgetrennt und anschließend wurde die obere Phase,

welche die genomische DNA und RNA enthält, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem 100 %igem (v/v) Ethanol für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um die DNA zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 16060 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das Pellet luftgetrocknet und in 400 μl TE-Puffer gelöst. Um die enthaltene RNA zu degradieren, wurden 3 μl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es folgte eine erneute Fällung der DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 100 %igem (v/v) Ethanol und Inkubation für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugieren (10 min, 16060 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert, mit 200 μl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 μl TE-Puffer gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde entweder für eine Southern Analyse verwendet oder zur Überprüfung von Gendelektionen als Matrize in eine PCR eingesetzt.

5.3 Manipulation von DNA

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion: PCR (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase chain reaction“, PCR) kann ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert werden. Hierzu wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) verwendet, die komplementär zum 3'-Ende (forward-Primer) bzw. umgekehrt komplementär zum 5'-Ende (reverse-Primer) des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind. Die Oligonukleotide hatten eine Länge von 19 bp bis 66 bp und eine Hybridisierungstemperatur von ungefähr $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um eine bessere Hybridisierung zu erzielen, enthielten die Oligonukleotide idealerweise ein C oder G am 3' Ende. Zur Amplifizierung von doppelsträngiger DNA wurden die thermostabilen Enzyme KOD DNA Polymerase, „Phusion High-Fidelity“ Polymerase, Taq DNA Polymerase und Pfu DNA Polymerase verwendet. Als Matrize dienten entweder Plasmid- oder Gesamt-DNA, die aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* isoliert wurden (vergleiche Kapitel 5.2.1, 5.2.2 und 5.2.3). Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5-50 pmol verwendet und zusammen mit 10-100 ng Matrizen-DNA in 20-100 μl Reaktionsvolumen entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Art und Dauer des Temperaturprofils richtete sich nach den Angaben des Herstellers, den verwendeten Oligonukleotiden und der Matrize und wurde in einem „Primus 25 advanced“, einem „Primus 96 advanced“ oder einem „TProfessional Basic Gradient“ PCR-Block durchgeführt.

Die PCR gliedert sich in fünf Schritte: die initiale Denaturierung (1.) und die erneute Denaturierung (2.), um die beiden DNA-Stränge der Matrize zu trennen, die Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize (3.), die Elongation (4.) und die finale Elongation (5.), in der die DNA synthetisiert wird. Die Schritte 2. bis 4. wurden 25 bis 30 Mal wiederholt.

1.	94 °C - 98 °C	0,5 - 5 min
2.	94 °C - 98 °C	10 - 30 sec
3.	54 °C - 60 °C	20 - 45 sec
4.	68 °C - 74 °C	0,16 - 5 min
5.	68 °C - 74 °C	5 - 10 min

5.3.2 Sequenzspezifische Mutagenese (Weiner et al., 1994)

Die sequenzspezifische Mutagenese ist eine einfache Methode, um mittels PCR Punktmutationen in ein Plasmid einzubringen. Die hierfür verwendeten Primer waren komplementär zu der Region, in die die Mutation eingeführt werden sollte und enthielten die gewünschte Punktmutation, welche von jeweils rund 15 bp flankiert wurden. In der PCR wurde das gesamte Plasmid amplifiziert, und um zusätzliche Mutationen zu vermeiden, wurden nur 15 Zyklen der PCR-Reaktion durchgeführt. Das lineare Plasmid wurde anschließend mit der T4-Ligase ligiert (vergleiche Kapitel 5.3.6) und die Matrizen-DNA durch Schneiden mit DpnI entfernt. DpnI ist eine Restriktionsendonuklease, welche methylierte und hemimethylierte DNA erkennt. Da das neu synthetisierte Plasmid nicht methyliert ist, wird es nicht durch DpnI geschnitten. Hierzu wurden im Anschluss an die PCR 20 U DpnI zu der Reaktion gegeben und der Ansatz bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert und aus den erhaltenen Klonen isoliert. Durch Sequenzierung wurde überprüft, ob die gewünschte Mutation enthalten war.

5.3.3 Restriktion von DNA

Für die enzymatische Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen und die Puffersysteme von LIFE TECHNOLOGIES GMBH (ehemals THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., ehemals FERMENTAS GMBH) und NEW ENGLAND BIOLABS INC. verwendet. Für die Restriktion mit zwei Enzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen verwendet. Für eine analytische Restriktion wurden ca. 500 ng DNA mit 1 bis 2 U Enzym in einem Volumen von 15 µl für 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert. Für eine präparative Restriktion wurden größere Volumina und Enzymmengen nach Bedarf eingesetzt. Die thermale Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben für 20 min bei 65 °C oder 80 °C.

5.3.4 Gelelektrophorese von DNA und RNA in Agarosegelen

Für analytische Gele, sowie Gele aus denen anschließend DNA isoliert werden sollte, wurde üblicherweise 1 % (w/v) Agarose in 1 × TAE-Puffer verwendet. Um die Qualität von RNA zu überprüfen, wurde 1 % (w/v) Agarose in 1 × TBE-Puffer verwendet. Hierfür wurde die Agarose in TAE- oder TBE-Puffer gelöst, aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurde die Agarose in einen Gelschlitten mit einem Kamm für die späteren Taschen gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm vorsichtig entfernt und der Gelschlitten in eine Gelkammer mit Laufpuffer eingesetzt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 × TAE- oder TBE-Puffer verwendet. Die aufzutrennenden DNA- bzw. RNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6 × DNA- bzw. RNA-Auftragspuffer versetzt und als Größenstandard wurde der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ verwendet. Die Auftrennung der DNA bzw. RNA erfolgte bei einer Spannung zwischen 10 V/cm und 20 V/cm und einer von der Spannung abhängigen Stromstärke für 30 bis 120 min. Für die Visualisierung der DNA bzw. RNA wurden die Gele für 15 min in einer 0,01 %igen (v/v) Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und überschüssiges Ethidiumbromid durch eine zehnminütige Inkubation in einem Wasserbad entfernt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der zwischen den Basen von Nukleinsäuren interkaliert und so die Detektion von DNA und RNA ermöglicht. Durch Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm konnten die DNA und RNA sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der aufgetrennten DNA bzw. RNA erfolgte unter Verwendung einer „GelDoc XR Systems“ DNA-Geldokumentationsanlage.

5.3.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein aufgetrenntes DNA-Fragment für weitere Experimente verwenden zu können, wurde das entsprechende Fragment nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe eines Skalpell oder Spatels unter dem UV-Transilluminator „IL-200-M/L“ bei einer Wellenlänge von 365 nm ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe des „E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit“ und des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Herstellerangaben isoliert und in 30 µl EB-Puffer eluiert. Die Größe des Fragments wurde in einem weiteren Agarosegel überprüft und die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem „ND-1000 NanoDrop®“ Spektrophotometer bestimmt. Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bei –20 °C.

5.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verbindung von PCR Produkten oder restriktionsenzymatisch geschnittener DNA erfolgte mit 2,5 U (1U/ μ l) T4-Ligase und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 μ l. Die T4-Ligase ist in der Lage sowohl glatte, als auch überhängende, kompatible Enden miteinander zu verknüpfen und benötigt ATP als Cofaktor. In die Reaktion wurden in der Regel 100 ng geschnittener Vektor eingesetzt und das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug in der Regel 1:3. Für eine „blunt-end“ Ligation von PCR Produkten wurde zudem PEG-6000 zum Reaktionsansatz gegeben. Die Ligation erfolgte für mindestens 3 h bei Raumtemperatur und anschließend wurden 10 μ l des Ligationsansatzes in 100 μ l chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (vergleiche Kapitel 5.4.1). Alternativ wurden 1 bis 2 μ l des Ligationsansatzes in 100 μ l elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert (vergleiche Kapitel 5.4.2).

5.3.7 Integration von DNA-Kassetten in das Genom von *S. cerevisiae* zur Erzeugung von Gendelektionen (Janke et al., 2004)

Um *STE7* zu deletieren, wurde eine Deletionskassette aus pKS133 per PCR amplifiziert. Hierfür wurden Oligonukleotide verwendet, welche am 5' Ende einen circa 45 bp langen Bereich enthielten, welcher homolog zu der Region im Genom ist, an der die Deletionskassette integriert werden sollte. Dieser Bereich ist gefolgt von einer Sequenz, welche für die Amplifizierung der Deletionskassette benötigt wird. Für die Amplifizierung einer Deletionskassette wurden ein S1- und ein S2-Primer verwendet. Der 5' Überhang des S1-Primers war komplementär zu rund 45 bp stromaufwärts des Startcodons (inkl. Startcodon) und darauf folgte die Sequenz 5'-CGTACGCTGCAGGTCGAC-3'. Der 5' Überhang des S2-Primers war revers komplementär zu rund 45 bp stromabwärts des Stoppcodons (inkl. Stoppcodon) und drauf folgte die Sequenz 5'-ATCGATGAATTCGAGCTCG-3'. Das erhaltene PCR Produkt wurde mit Ethanol gefällt und anschließend in kompetente Hefezellen transformiert (vergleiche Kapitel 5.3.8 und 5.4.3). Die Integration der PCR-Kassette ins Genom erfolgte über homologe Rekombination und positive Klone wurden auf dem entsprechenden Selektivmedium angezogen. Die erfolgreiche Integration wurde per PCR überprüft. Hierfür wurde die genomische DNA (vergleiche Kapitel 5.2.3) der zu testenden Klone als Matrize und ein KO-Primer, welcher rund 300 bp stromaufwärts des Startcodons bindet, sowie ein Primer, welcher im Marker der Deletionskassette bindet, verwendet.

5.3.8 Fällung von DNA mit Ethanol

Um in Lösung befindliche DNA zu fällen, wurde das 2,5 fache Volumen eiskaltes 100 %iges (v/v) Ethanol zugegeben und gemischt. Die Fällung erfolgte für 10 min bis 1 h bei -20°C und die gefällte DNA wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 16060 g und 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 200 μl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 μl EB-Puffer oder Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

5.4 Transformationsmethoden

5.4.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (modifiziert nach Mandel and Higa, 1970)

Die verwendeten *E. coli*-Zellen wurden zunächst über Nacht in 10 ml LB-Medium bei 37°C angezogen. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1:100 verdünnte Hauptkultur mit einem Volumen von 500 ml bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und daraufhin 15 min bei 3399 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 130 ml vorgekühlter RF1-Lösung resuspendiert, für weitere 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 3399 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 32 ml vorgekühlter RF2-Lösung gelöst, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend je 100 μl kompetente Zellen in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 μl Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 45 sec bis 1 min bei 42°C und die Zellen wurden mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 2376 g pelletiert, im Restmedium resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.4.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter *E. coli*-Zellen (modifiziert nach Dower et al., 1988)

Für die Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen wurden die verwendeten Stämme zunächst über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezogen. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1:100 verdünnte Hauptkultur mit einem Volumen von 200 ml schüttelnd bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 bis 30 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 5311 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem dH_2O

gewaschen (einmal mit 50 ml und einmal mit 30 ml) und die Zellen in 5 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 5311 g, 4 °C) wurden die Zellen in 400 µl eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert und je 50 µl kompetente Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 2 µl Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (1 mm Spaltbreite) überführt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mittels eines „Gene Pulser™“, indem die Zellen einem elektrischen Impuls ausgesetzt wurden (2,2 kV Spannung, 200 Ω Widerstand, 25 µF Kapazität) und die dafür benötigte Zeit sollte idealerweise zwischen 4,4 und 4,7 msec liegen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 2376 g pelletiert, im Restmedium resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4.3 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen (modifiziert nach Knop et al., 1999)

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurden die entsprechenden Hefestämme zunächst über Nacht in 10 ml YEPD bei 30 °C angezogen. Am nächsten Tag wurde damit eine Hauptkultur mit einem Volumen vom 50 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 30 °C in einem Erlenmeyerkolben schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 min, 850 g) pelletiert und einmal mit 25 ml sterilem Wasser und einmal mit 5 ml SORB-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 360 µl SORB-Puffer resuspendiert und mit 40 µl frisch denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml; 10 min bei 100 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt) gemischt. Die kompetenten Hefezellen wurden in 100 µl Aliquots aufgeteilt und entweder direkt zur Transformation verwendet, oder bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit DNA sowie 600 µl PEG-Puffer gemischt. Für die Transformation von integrativen Plasmiden und PCR Produkten wurden 30 µl gefällte DNA zugegeben, für die Transformation von Centromer-basierten Plasmiden (YCplac-Serie) wurden 1 bis 2 µg Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42 °C und die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 380 g) pelletiert und mit 1 ml YEPD gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml YEPD gelöst und in Abhängigkeit des metabolischen Markers beziehungsweise der Antibiotikaresistenz erfolgte eine Regeneration

für 1 bis 6 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 4 Tage bei 30 °C.

5.5 Analyse von DNA

5.5.1 Sequenzierung (modifiziert nach Sanger et al., 1977)

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 7 bzw. 10 µl gemischt und mittels Kettenabbruchmethode durch die Firma SEQLAB-SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GMBH sequenziert. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit der Software „Sequencher“ (Version 4.10.1 Demo, GENE CODES CORPORATION) analysiert.

5.5.2 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für die Southern Analyse

Um ein bestimmtes DNA-Fragment mittels Southern-Analyse zu detektieren, wurden 590 bp bis 640 bp große DIG-markierte DNA-Sonden in einer PCR amplifiziert. Hierfür wurde Plasmid-DNA als Matrize (vergleiche Tab. 9), die entsprechenden Oligonukleotide (vergleiche Tab. 10) und der „PCR DIG Labeling Mix“ nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Mix enthält neben den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP außerdem Digoxigenin-11-dUTP, welches bei der PCR ebenfalls in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird. Die Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich nach den verwendeten Oligonukleotiden und der Länge der Sonde. Die Sonde konnte bis zu sechsmal wiederverwendet werden und wurde vor der Verwendung für 10 min bei 100 °C in einem Wasserbad denaturiert.

5.5.3 Nachweis von DNA: Southern-Analyse (Southern, 1975)

Um die korrekte Integration von integrativen Plasmiden in das Genom von *S. cerevisiae* zu überprüfen, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode kann ein spezifisches Fragment in einer Mischung aus DNA-Fragmenten identifiziert werden. Die Identifizierung des DNA-Fragments erfolgt mit Hilfe einer spezifischen, markierten Sonde, welche mit dem Fragment hybridisieren kann. Die Detektion des entstandenen Hybrid kann beispielsweise mittels eines Digoxigenin-spezifischen Antikörpers erfolgen.

Für die Southern Analyse wurde zunächst die genomische DNA aus den entsprechenden Stämmen isoliert (vergleiche Kapitel 5.2.3) und 20 µl der Präparation mit einem geeigneten Enzym über Nacht bei 37 °C geschnitten, um die DNA zu fragmentieren. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein 0,8 %iges oder 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und bei einer

Spannung von 12 V/cm und einer von der Spannung abhängigen Stromstärke für 60 bis 90 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zweimal für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren, wodurch sie in kleinere Fragmente zerbrechen kann. Dies ermöglicht einen effizienten Transfer von Fragmenten über 5 kb. Während dieses Schritts wechselt die Farbe des Bromphenolblaus des DNA-Ladepuffers zu gelb. Anschließend wurde das Gel kurz mit dH₂O gespült und für 30 min in 0,5 M NaOH 1 M NaCl (pH 14) geschwenkt, um die DNA zu denaturieren. Während dieses Schritts wechselt die Farbe des Bromphenolblaus wieder zu blau zurück. Die Neutralisierung erfolgte durch zweimaliges Waschen für 30 min in 1 M NH₄Ac 0,02 M NaOH (pH 7.5). Die fragmentierte Gesamt-DNA wurde mittels Kapillarblot für mindestens 3 h oder über Nacht aus dem vorbehandelten Agarosegel auf eine positiv geladene „Roti®-Nylon Plus“ Membran transferiert. Der Blot setzte sich hierbei von unten nach oben folgendermaßen zusammen: kopfstehendes Agarosegel, Nylonmembran, zwei Lagen „Blotting Paper“, Papierhandtücher und ein ca. 1 kg schweres Gewicht. Beim Kapillarblot bewegt sich die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte durch das Gel und die Membran zu dem Papierstapel. Auf diese Weise werden die DNA-Moleküle zu der positiv geladenen Membran transportiert, an welcher sie dann adhären. Anschließend wurde die Membran für 10 min getrocknet und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Energiedichte von 120.000 µJ/cm² in einem „Stratalinker® UV Crosslinker 2400“ UV-Strahlungsgerät kovalent an die Membran gebunden. Die Nylonmembran konnte so entweder bei 4 °C aufbewahrt, oder direkt weiter verwendet werden. Die Membran wurde dann für 30 min bis 2 h bei 65 °C mit 30 ml vorgewärmtem Southern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert und daraufhin über Nacht mit der entsprechenden DIG-markierten, frisch denaturierten DNA-Sonde (100 µl in 30 ml Southern-Hybridisierungspuffer; vergleiche Kapitel 5.5.2) ebenfalls bei 65 °C hybridisiert. Die hohe Temperatur gewährleistet eine spezifische Bindung der Sonde. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 20 min bei 65 °C mit 30 ml Southern-Waschpuffer, und 5 min bei Raumtemperatur mit 30 ml DIG-Waschpuffer gewaschen. Durch 30-minütige Inkubation mit 40 ml DIG2-Puffer (Blockierlösung) wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt. Um die Detektion der gebundenen Sonde zu ermöglichen, wurde die Membran 1 h mit 10 ml Antikörperlösung (Schaf-anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment für 5 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert, 1:10.000 verdünnt in DIG2) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 15 min mit DIG-Waschpuffer entfernt und die Membran wurde für 5 min in 30 ml 1 × „CDP-Star“ Verdünnungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran 5 min in aufgetauter „CDP-Star“-Lösung inkubiert (bis zu sechsmal wiederverwendbar), luftblasenfrei

in Plastikfolie eingeschweißt, um ein Trocknen der Membran zu verhindern und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Das „CDP-Star“ wird durch die alkalische Phosphatase aktiviert und das Signal erreicht nach 15 min sein Maximum und nimmt über mehrere Tage langsam ab. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit Hilfe des Chemolumineszenz-Detektions-Gerät „Chemostar Professional Apparatur“. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalstärke und betrug in der Regel 8 bis 20 min.

5.6 Analyse von RNA

5.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* (modifiziert nach Cross and Tinkelenberg, 1991)

Um den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Expression von *TEC1* und *FLO11* zu untersuchen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme zunächst in einer Hauptkultur mit einem Volumen von 100 ml von einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,6 bei 30 °C angezogen und daraufhin aufgeteilt und unter verschiedenen Umweltbedingungen weiter inkubiert (vergleiche Kapitel 5.1.2). Um den Einfluss einer C-terminalen YFP-Markierung auf die *TEC1*-Transkriptmenge zu untersuchen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 angezogen (vergleiche Kapitel 5.1.2). Davon wurden anschließend jeweils 25 ml für 4 min bei 1912 g zentrifugiert, das Pellet in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei 3421 g wurden die Zellen pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Für die Extraktion der RNA wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und mit 400 µl „Cross“-RNA-Puffer I, 400 µl „Roti®-Aqua-P/C/I zur RNA Extraktion“, sowie 600 mg Glasperlen (Ø 0,25 bis 0,5 mm) versetzt und die Zellen für 8 min bei 4 °C auf einem Multivortexer „Vibrax VXR Basic“ aufgebrochen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt, um das Risiko einer Degradierung der RNA zu minimieren. Anschließend wurden weitere 400 µl „Cross“-RNA-Puffer I zu dem Ansatz gegeben und durch Invertieren gemischt. Darauf folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 16060 g und 4 °C, um die Zelltrümmer und denaturierten Proteine von der oberen, wässrigen Phase zu trennen, welche die RNA enthält. Die obere Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml eiskaltem 100 %igen (v/v) Ethanol gemischt und für 10 min bei –80 °C inkubiert, um die RNA zu fällen. Die gefällte RNA wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 16060 g und 4 °C pelletiert, das RNA-Pellet für 15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in 30 µl „Cross“-RNA-Puffer II (Northern-Analyse) oder dH₂O (quantitative Real-Time PCR) gelöst. Die Konzentration der RNA wurde

mit Hilfe des „ND-1000 NanoDrop®“ Spektrophotometer und die Reinheit und Qualität mittels Gelelektrophorese in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel mit $1 \times$ TBE-Puffer bestimmt. Zwei klare Banden, welche die 18 S und 28 S rRNA repräsentieren, zeigten eine gute Qualität der RNA wohingegen Schmier innerhalb einer Spur auf eine hohe Degradierung hin deutete.

5.6.2 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden für die Northern-Analyse

Um ein bestimmtes Transkript mittels Northern-Analyse zu detektieren, wurden 349 bp bis 640 bp große, radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet, welche zunächst in einer PCR amplifiziert wurden. Hierfür wurde Plasmid-DNA als Matrize (vergleiche Tab. 9) und die entsprechenden Oligonukleotide (vergleiche Tab. 10) verwendet. Anschließend wurde die erhaltene Sonde nach dem Protokoll für die Aufreinigung von DNA nach einer enzymatischen Reaktion über eine Säule gereinigt („E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit“) und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Für die radioaktive Markierung wurde das „Amersham™ Megaprime DNA Labeling System“ verwendet. Hierfür wurden zunächst 50 ng aufgereinigte DNA mit 5 µl „Random Primer Mix“ (Hexamere) in einem Gesamtvolumen von 33 µl gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 10 µl „Labeling Mix“, 2 µl Klenow-Polymerase und 5 µl [α -P³²]dCTP mit einer Aktivität von 18,5 MBq zugegeben. Die Synthese der radioaktiv markierten Sonde erfolgte für 30 min bei 37 °C. Hierbei lagern sich die Hexamere an die denaturierte DNA-Matrize und mit Hilfe der Klenow-Polymerase wird daraus eine radioaktiv markierte DNA-Sonde synthetisiert. Die Klenow-Polymerase inkorporiert hierzu sowohl nicht markierte dNTPs, als auch [α -P³²]dCTP in den neu synthetisierten Strang. Durch die Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurde die neu synthetisierte Sonde mit Hilfe einer „MobiSpin S-200“ Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei 800 g nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sonde wurde dann erneut für 5 min bei 99 °C denaturiert. Die radioaktiv markierten Sonden konnten mehrmals verwendet werden und die Halbwertszeit betrug 14 Tage. Die Lagerung der Sonden erfolgte bei -20 °C. Vor der Verwendung wurden die Sonden für 15 min in einem Wasserbad bei 95 °C denaturiert.

5.6.3 Nachweis von RNA: Northern-Analyse (modifiziert nach McMaster and Carmichael, 1977)

Um die Menge eines Transkriptes und somit die Genexpression bestimmen zu können, wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Die Identifizierung des Transkriptes erfolgte mit Hilfe einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde (vergleiche Kapitel 5.6.2), welche mit dem Transkript hybridisieren kann.

Die RNA-Fragmente wurden zunächst entsprechend ihrer Größe unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,4 %igen (w/v) Agarosegel (2,1 g Agarose in 135 ml dH₂O und 15 ml 10 × MOPS-Puffer) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Pro Spur wurden je 17 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl aufgetragen:

RNA	17 µg
10 × MOPS-Puffer	2,4 µl
8 M Glyoxal	2,4 µl
DMSO	12 µl
RNA-Ladepuffer	4 µl

Das Gemisch wurde zunächst für 15 min bei 65 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 2,5 h bei einer Spannung von 70 V/cm und einer von der Spannung abhängigen Stromstärke. Als Laufpuffer wurde 1 × MOPS-Puffer verwendet. Um zu vermeiden, dass der Ionengradient innerhalb des Laufpuffers zu hoch ist, wurde der Laufpuffer nach ca. 1,5 h kurz durchmischt. Anschließend wurde das Gel zweimal mit dH₂O gewaschen und die Taschen entfernt.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA wurde dann mittels Kapillarblot über Nacht aus dem Agarosegel auf eine neutrale „Hybond™-N“ Nylonmembran transferiert. Der Blot setzte sich hierbei von unten nach oben folgendermaßen zusammen: Wanne mit 10 × SSC-Puffer, umgedrehter Gelschlitten, „Blotting Paper“ als Brücke zum Pufferreservoir, kopfstehendes Agarosegel, Nylonmembran, zwei Lagen „Blotting Paper“, Papierhandtücher und ein ca. 1 kg schweres Gewicht. Anschließend wurde die Membran für 10 min getrocknet und die RNA durch zweimalige Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Energiedichte von 120.000 µJ/cm² in einem „Stratalinker® UV Crosslinker 2400“ UV-Strahlungsgerät kovalent an die Membran gebunden. Um den erfolgreichen Transfer, sowie die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen, wurden die beiden 18 S und 28 S rRNA-Banden durch zehnmünütige Inkubation in Methylenblau-Lösung und anschließendes Waschen mit dH₂O sichtbar gemacht. Zwei klare Banden zeigten eine gute Qualität der RNA, wohingegen Schmier innerhalb einer Spur auf eine hohe Degradierung hin deutete.

Da *TEC1* nur sehr schwach exprimiert ist, wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet, welche im Vergleich zu DIG-markierten DNA-Sonden sensibler sind. Hierzu wurde die Membran zunächst für 2 h bei 65 °C in 50 ml Northern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert und anschließend über Nacht bei 65 °C mit der frisch denaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Am drauf folgenden Tag wurde die Membran dreimal für

20 min bei 65 °C mit 50 ml Northern-Waschpuffer gewaschen und dann luftgetrocknet. Die getrocknete Membran wurde in einen Plastikbeutel eingeschweißt und in einer „Storage Phosphor Cassette“ exponiert. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalintensität und betrug zwischen zwei und fünf Tagen. Die „Storage Phosphor Cassette“ wurde in einem „Storm860 Phosphorimager“ ausgelesen.

Um die *CDC42* mRNA als Ladekontrolle detektieren zu können, wurde die erste Sonde durch zweistündige Inkubation bei 80 °C mit 50 ml Northern-Stripping-Puffer von der Membran entfernt. Anschließend wurde die Membran erneut für 2 h bei 65 °C in 50 ml Northern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert und anschließend über Nacht bei 65 °C mit der frisch denaturierten, zweiten Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte analog zur Detektion des ersten Transkripts. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe der Software „LabImage 1D“ (KAPELAN BIO-IMAGING GMBH). Hierfür wurden die Banden manuell ausgewählt und der Quantifizierungswert (Produkt aus Anzahl und Intensität der Pixel) für *TEC1* und *CDC42* gemessen. Anschließend wurde für jedes Extrakt der für *TEC1* erhaltene Wert durch den für *CDC42* geteilt und die relative Menge in Prozent im Vergleich zu einem Stamm mit nativem Tec1, Ste12 und Ste7 berechnet.

5.6.4 Restriktionsenzymatische Spaltung mit DNaseI

Da eine Kontamination der RNA Proben mit DNA zu falsch positiven Ergebnissen in der quantitativen Real-Time PCR führen kann, wurde die enthaltene DNA degradiert. Hierzu wurden 10 µg Gesamt-RNA mit 10 U DNaseI und dem entsprechenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl nach Herstellerangaben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei der DNaseI handelt es sich um eine Endonuklease, welche unspezifisch DNA schneiden kann. Um die DNaseI zu inaktivieren, wurden 5 mM EDTA zugegeben und der Ansatz 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNaseI durch eine Phenolreinigung entfernt. Hierfür wurden 110 µl „Roti®-Aqua-P/C/I zur RNA Extraktion“ zugegeben, der Ansatz gemischt und für 10 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem 2,5 × Volumen eiskaltem 100 %igem (v/v) Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M Stammlösung) gemischt und die RNA für 30 min bei –20 °C gefällt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 16060 g und 4 °C wurde die gefällte RNA pelletiert und das Pellet dann zweimal mit 1 × Volumen 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und jeweils 10 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss in 30 µl dH₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des „ND-1000

NanoDrop® Spektrophotometer und die Reinheit und Qualität mittels Gelelektrophorese in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel mit 1 × TBE-Puffer bestimmt. Zwei klare Banden, welche die 18 S und 28 S rRNA repräsentieren und die Abwesenheit von weiteren Banden und Schmier zeigten eine hohe Reinheit und Qualität der RNA.

5.6.5 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ verwendet. Zur Amplifikation der cDNA wurden 500 ng aufbereitete RNA mit 4 µl 5 × „iScript Reaction Mix“ und 1 µl „iScript Reverse Transcriptase“ in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Der „iScript Reaction Mix“ enthält eine Mischung aus Oligo(dT) und zufälligen Hexamer Primern. Bei der im Kit enthaltenen reversen Transkriptase handelt es sich um eine modifizierte reverse Transkriptase des Moloney murinen Leukämievirus (MMLV). Der Vorteil der MMLV reversen Transkriptase ist, dass auch lange bzw. vollständige cDNA Transkripte synthetisiert werden können. Das Temperaturprofil für die cDNA Synthese setzte sich wie folgt zusammen:

- | | | |
|----|-------|--------|
| 1. | 25°C | 5 min |
| 2. | 42 °C | 30 min |
| 3. | 85 °C | 5 min |

Im Anschluss wurden der Reaktion 5 µl Nuklease-freies Wasser zugegeben, um eine Konzentration von 20 ng/µl an cDNA zu erhalten.

5.6.6 Quantitative Real-Time PCR mit „iQ™ SYBR® Green Supermix“ (BIO-RAD LABORATORIES GMBH)

Bei der quantitativen Real-Time PCR wird die Zunahme des PCR Produktes in Echtzeit erfasst und gemessen. Die Erfassung der Zunahme erfolgte in dieser Arbeit durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green I, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional zu der Menge an PCR Produkt zu. Hierfür wurde ein spezialisierter PCR-Block verwendet, der mit einem Modul ausgestattet ist, welches die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und die Detektion der Fluoreszenzsignale ermöglicht.

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt (vergleiche Tab. 10) und als Referenzgen diente *CDC28*. Die Primer wurden so gewählt, dass sie im hinteren Bereich des Leserahmens binden und die Amplikon Größe betrug zwischen 109 bp und 118 bp. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 1 µl cDNA, jeweils 500 nM Primer und 10 µl 2 × „iQ™ SYBR® Green Supermix“ in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammen. Bei dem

„iQ™ SYBR® Green Supermix“ handelt es sich um einen Mastermix, welcher eine „Hot-start iTaq DNA-Polymerase“, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I Farbstoff, Verstärker, Stabilisatoren und Fluorescein enthält. Zudem wurde für jedes Primerpaar ein Ansatz ohne cDNA hergestellt, um eine potentielle Kontamination feststellen zu können. Die quantitative Real-time PCR wurde in Duplikaten in „Multiplate™ PCR Plates“ in einem „CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System“ unter Verwendung der „CFX Manager™“ Software (BIO-RAD LABORATORIES GMBH; Version 3.0) durchgeführt und das Temperaturprofil setzte sich wie folgt zusammen:

1.	95 °C	30 sec
2.	95 °C	15 sec
3.	60 °C	30 sec
4.	72 °C	30 sec

Die Schritte 2 bis 4 wurden 45 Mal wiederholt und am Ende jedes Zyklus wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Nach dem letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur kontinuierlich von 65 °C auf 95 °C in 0,5 °C Schritten erhöht, um die DNA zu denaturieren. Da jedes Amplifikat eine spezifische Schmelztemperatur hat, kann so zwischen dem Amplifikat und potentiellen unspezifischen Produkten oder Primer-Dimeren unterschieden werden.

Der Ct-Wert (Cycle threshold) wurde automatisch durch die Software bestimmt. Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet. Der Ct-Wert wird durch die Menge der mRNA und somit der cDNA bestimmt. Je mehr mRNA bzw. cDNA in einer Probe vorhanden ist, desto früher wird der Schwellenwert überschritten und desto niedriger ist somit der Ct-Wert.

Für die Quantifizierung der Genexpression wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe des „CFX Manager™“ in „Microsoft Excel“ (MICROSOFT DEUTSCHLAND GMBH) exportiert, jede Probe nach Angaben des Herstellers mit der Formel $2^{Ct(\text{Referenz}) - Ct(\text{Zielgen})}$ normalisiert und der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten gebildet. Anschließend wurde die Änderung der Mutanten im Verhältnis zum unter Normalbedingungen angezogenen Wildtyp in Prozent berechnet und der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens 3 Replikaten gebildet.

5.7 Analyse von Proteinen

5.7.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die immunochemische Detektion (modifiziert nach Riezmant et al., 1983)

Um den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Tec1-Proteinmenge zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme zunächst in einer Hauptkultur mit einem Volumen von 100 ml von einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,6 bei 30 °C angezogen, daraufhin aufgeteilt und unter verschiedenen Umweltbedingungen weiter inkubiert (vergleiche Kapitel 5.1.2). Um die Tec1-Proteinmenge in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme zunächst in einer Hauptkultur mit einem Volumen von 100 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für 3 h bei 30 °C angezogen, daraufhin aufgeteilt und in An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin weiter inkubiert (vergleiche Kapitel 5.1.2). Davon wurden anschließend zu mehreren Zeitpunkten jeweils 2 OD Zellen entnommen. Um die Tec1-Proteinmenge in diploiden Stämmen zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und anschließend 2 OD Zellen entnommen. Für die Untersuchung des Einflusses einer C-terminalen YFP-Markierung auf die Tec1-Proteinmenge wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme ebenfalls bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und 2 OD Zellen entnommen. Die Zellen wurden für 2 min bei 16060 g zentrifugiert, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden die Proben mit 1 ml dH₂O versetzt und 150 µl alkalischer Lyse-Puffer zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis, unter mehrmaligem Vortexen, wurden zur Neutralisation 150 µl 50 %iges (w/v) TCA zugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden anschließend durch zehnminütige Zentrifugation bei 16060 g und 4 °C pelletiert und in 100 µl Harnstoffpuffer resuspendiert. Die Proteinextrakte wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert, oder für 10 bis 20 min bei 37 °C auf einem „ThermoMixer C“ schüttelnd inkubiert, 5 min bei 16060 g zentrifugiert und direkt in eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

5.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierbei wird das Detergent SDS zugegeben, um die Proteinfaltungen zu trennen und eine negative Ladung der Proteine zu erreichen. Disulfidbrücken werden durch das β-Mercaptoethanol im alkalischen Lyse-Puffer

und DTT im Harnstoffpuffer aufgespalten. Die für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Gele bestehen aus zwei Schichten, dem Sammelgel und den Trenngel, welche sich im pH-Wert und der Porengröße unterscheiden. Das Sammelgel hat größere Poren und soll sicherstellen, dass alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel einlaufen. Das Trenngel hingegen hat feinere Poren und dient der Trennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse. In dieser Arbeit wurden 12 %ige (v/v) Polyacrylamid-Gele verwendet und die Zusammensetzung für zwei Gele ist in der nachstehenden Tabelle angegeben.

Tab. 12: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.

	Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	3,5 ml	3,9 ml
4 × „Upper Tris“, pH 6,8	-	1,5 ml
4 × „Lower Tris“, pH 8,8	2,5 ml	-
„Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)“	4 ml	0,6 ml
10 % APS	25 µl	40 µl
TEMED	15 µl	20 µl

Die Gelelektrophorese erfolgte in „Mini-PROTEAN®3“ Kammern, welche mit 1 × Elektrophoresepuffer gefüllt wurden. Pro Spur wurden 10 µl Proteinextrakt aufgetragen und als Größenstandard wurden 6 µl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Zunächst wurde für 10 min eine Spannung von 10 V/cm angelegt, um den Eintritt der Proben in das Trenngel zu ermöglichen. Anschließend wurde die Spannung für 45 min auf 28 V/cm erhöht, bis die blaue Lauffront des Harnstoffpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte.

5.7.3 Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Towbin et al., 1979)

Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die Gelelektrophorese mittels eines Elektroblobs auf eine „Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Blotting Membrane“ transferiert. Der Blot erfolgte über Nacht bei 35 V in „Mini Transfer Electrophoretic Transfer“ Kammern und 1 × Transferpuffer. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde durch zweiminütiges Schwenken in Ponceau-Lösung und anschließendes, mehrmaliges Waschen mit dH₂O überprüft. Die so angefärbten Proteine wurden fotografisch dokumentiert und die Membran anschließend durch mehrmaliges Waschen mit 1 × TBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween® 20 (TBS-T-Puffer) entfärbt. Um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzudecken, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 1 × TBS-T-Puffer mit 4 % (w/v) Milchpulver inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper

(Tab. 5) erfolgte für 1 bis 3 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C in TBS-T-Puffer mit Milchpulver. Anschließend wurde die Membran einmal für 7 min mit TBS-T-Puffer mit Milchpulver und zweimal mit TBS-T-Puffer gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurde die Membran für 1 bis 1,5 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 6) bei Raumtemperatur in TBS-T-Puffer mit Milchpulver inkubiert, gefolgt von drei weiteren Waschschritten. Manche Antikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben mit 3 % (w/v) Milchpulver statt 4 % (w/v) behandelt (anti-Tubulin). Für die Detektion der Antikörper-gebundenen Proteine wurde die ECL-Methode verwendet (Tesaigzi et al., 1994). Hierfür wurden zunächst je 10 ml ECL-Lösung I und ECL-Lösung II separat hergestellt und dann direkt vor der Inkubation der Membran gemischt. Die Membran wurde für 1 bis 2 min bei Raumtemperatur in der Mischung schüttelnd inkubiert, auf eine nicht-reflektierende Plastikplatte überführt und mit einer Plastikfolie abgedeckt. Bei der ECL-Reaktion oxidiert die Peroxidase das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol, wodurch es zur Chemilumineszenz kommt. Die Chemilumineszenz wurde unter Verwendung einer „Chemostar Professional Apparatur“ detektiert und die Expositionszeit wurde in Abhängigkeit der Signalstärke gewählt. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe der Software „LabImage 1D“ (KAPELAN BIO-IMAGING GMBH). Hierfür wurden die Banden manuell ausgewählt und der Quantifizierungswert (Produkt aus Anzahl und Intensität der Pixel) für Tec1 und Tub1 gemessen. Anschließend wurde für jedes Extrakt der für Tec1 erhaltene Wert durch den für Tub1 geteilt und die relative Menge in Prozent im Vergleich zum unter Normalbedingungen angezogenen Wildtyp berechnet.

Um ein weiteres Protein detektieren zu können, wurden die gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für 20 min bei Raumtemperatur mit 3 % (w/v) TCA entfernt und die Membran anschließend zur Neutralisation dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Alternativ wurde die Membran für 30 bis 45 min bei 65 °C mit „Strip“-Puffer inkubiert, mehrmals mit dH₂O gewaschen und dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

5.7.4 Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen (modifiziert nach Bennett and Scott, 1971)

Für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau wurde das Polyacrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen zunächst für 5 min mit Entfärbelösung äquilibriert. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine durch eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur in Coomassie Brilliant Blau-Lösung. Das Gel wurde dann mehrmals mit Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren und anschließend eingescannt.

5.8 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Proteinen

5.8.1 Expression von *MBP-TEC1-FLAG* und *MBP-STE12-FLAG* (Madhani and Fink, 1997)

Für die heterologe Expression von *MBP-TEC1-FLAG* (BHUM0388) und *MBP-STE12-FLAG* (BHUM0389) wurde der *E. coli*-Stamm BL21-Gold (DE3) verwendet (Tab. 7). Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C in LB-Medium, welches mit 1 % (w/v) Glukose und Ampicillin versetzt wurde, angezogen. Durch Zugabe von Glukose soll die Produktion der Amylase verhindert werden, welche die Amylose des Amylose-Resin abbauen kann. Am nächsten Tag wurde damit eine Hauptkultur mit einem Gesamtvolumen von 2 l auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 20 °C schüttelnd inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 0,3 mM IPTG (*MBP-TEC1-FLAG*) bzw. 0,5 mM IPTG (*MBP-STE12-FLAG*). Nach 4 h wurden die Zellen durch 15-minütige Zentrifugation in einer „Sorvall RC-5B Plus Superspeed“ Standzentrifuge mit dem „SLA-3000“-Rotor bei 4229 g und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde mit 40 ml des entsprechenden Bindepuffer gewaschen, für 15 min bei 5525 g und 4 °C zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

5.8.2 Affinitätschromatographie von *MBP-Tec1-FLAG* und *MBP-Ste12-FLAG* (Madhani and Fink, 1997)

Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und in 30 ml des entsprechenden Bindepuffers resuspendiert. Dem Bindepuffer wurden 1 mM DTT und 1 mM PMSF als Proteaseinhibitoren zugegeben. Für den Zellaufschluss wurde eine „French Pressure Cell Press“ French Press verwendet. Dazu wurde die Zellsuspension dreimal bei einem Druck von 1000 psi durch eine schmale Öffnung gepresst. Der Zellextrakt wurde für 45 min bei 125862 g und 4 °C in einer „Optima™ L-90K“ Ultrazentrifuge mit dem „Ti70“-Rotor zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Anschließend wurde der Überstand, welcher die Proteine enthält, abgenommen und mit dem entsprechenden Bindepuffer, welcher mit DTT und PMSF versetzt war, auf ein Volumen von 45 ml aufgefüllt. Für die Affinitätschromatographie wurde eine Säule mit Amylose-Resin verwendet. Das Säulenmaterial hatte ein Volumen von etwa 1,8 ml und wurde mit dem entsprechenden Bindepuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde schrittweise bei 4 °C auf die Säule gegeben. Hierbei wurde die Durchflussgeschwindigkeit durch die Gravitation bestimmt, sie betrug 5 bis 10 min/ml. Anschließend wurde die Säule mit dem entsprechenden Bindepuffer, welcher mit DTT und PMSF versetzt war, gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in zehn Schritten mit je 1 ml des entsprechenden Bindepuffers, dem 10 mM Maltose zugegeben wurde,

eluiert. Die Konzentration und Reinheit wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese (vergleiche Kapitel 5.7.2) und eine anschließende Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau (vergleiche Kapitel 5.7.4) überprüft. Die Eluate mit den höchsten Konzentrationen wurde vereinigt und die Konzentration der Protein-Lösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem „ND-1000 NanoDrop®“ Spektrophotometer bestimmt. Die Protein-Lösung wurde mit einer Endkonzentration von 25 % (v/v) Glycerin versetzt und bei –80 °C gelagert.

5.9 *In vitro* Interaktionstest von Proteinen mit DNA: Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

5.9.1 Herstellung Cyanin 5.5-markierter DNA-Fragmente

Um die Bindung von MBP-Tec1 und MBP-Ste12 an den *TEC1* Promotor *in vitro* zu untersuchen, wurden 509 bp große DNA-Fragmente des *TEC1* Promotors in einer PCR amplifiziert und dabei mit dem Fluorophor Cyanin 5.5 (Cy 5.5) markiert. Hierfür wurde Plasmid-DNA als Matrize (Tab. 9) und die entsprechenden Oligonukleotide verwendet (Tab. 10), wobei der forward-Primer am 5' Ende mit Cy 5.5 markiert war. Die Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich nach den verwendeten Oligonukleotiden und der Länge des DNA-Fragments. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des „ND-1000 NanoDrop®“ Spektrophotometer bestimmt.

5.9.2 Gelretardierungsexperiment (EMSA) (modifiziert nach Garner and Revzin, 1981)

Mittels eines Gelretardierungsexperiments kann die Interaktion zwischen Proteinen und DNA nachgewiesen werden. Durch Inkubation eines Proteins mit einem bekannten DNA-Fragment und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung können Protein-DNA Interaktionen nachgewiesen werden. Bindet ein Protein an die DNA, wird die Mobilität des DNA-Fragments beeinträchtigt, da Protein-DNA Komplexe sich langsamer durch ein Gel bewegen, als freie DNA (Gelretardation). Für die Visualisierung der Komplexe wird in der Regel die DNA mit einem Radionuklid oder einem Fluorophor markiert. In dieser Arbeit wurde die DNA mit Cy 5.5 markiert (vergleiche Kapitel 5.9.1).

Für die Protein-DNA Interaktion wurden jeweils 80 fmol DNA und 3,3 pmol MBP-Tec1-FLAG bzw. 5,1 pmol MBP-Ste12-FLAG mit 2,5 µl 10 × Bindepuffer, 0,4 µl 1 M DTT, 2 µl BSA, 2 µl Poly (dI-dC) und 1 µl Complete in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt. Poly (dI-dC) wurde als Kompetitor verwendet, um eine unspezifische Protein-DNA Interaktion zu minimieren. Der Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Interaktion

der Proteine mit der DNA zu ermöglichen. Wenn sowohl MBP-Tec1-FLAG, als auch MBP-Ste12-FLAG zu dem Ansatz gegeben wurden, wurden zunächst die Proteine miteinander gemischt und vor der Zugabe zum restlichen Reaktionsansatz für 10 min auf Eis inkubiert, um eine Interaktion zwischen den Proteinen zu ermöglichen. Anschließend wurden 5 µl Ladepuffer zum Reaktionsansatz gegeben und der gesamte Ansatz auf ein natives, 4 %iges (v/v) Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Tab. 13: Zusammensetzung der nativen Polyacrylamid-Gele.

dH ₂ O	81,7
5 × TBE-Puffer	5 ml
„Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)“	13,3 ml
10 % APS	600 µl
TEMED	60 µl

Die Auftrennung der Protein-DNA Komplexe erfolgte zunächst für 5 min bei 12 V/cm und dann für 2 h bei 9 V/cm in 0,5 × TBE-Puffer. Anschließend wurde das Gel mit dem „Typhoon Trio Variable-Mode Imager“ eingescannt. Hierbei wird mit Hilfe eines roten Lasers Cy 5.5 bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und ermöglicht so die Bestimmung der Position der Protein-DNA Komplexe im Gel.

5.10 Untersuchung von *S. cerevisiae*

5.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden zunächst Vorkulturen von Stämmen, welche Fluoreszenz-Reportergene trugen, sowie die entsprechenden Kontrollen ohne Reportergen in 2 ml LFM-Medium mit 1,7 mM Leucin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil über Nacht bei 30 °C angezogen. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1:10 verdünnte Hauptkultur mit einem Gesamtvolumen von 5 ml für 4 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und jeder Stamm wurde einerseits mit 1 µM α-Faktor oder der entsprechenden Menge Methanol als Kontrolle für 90 min weiter bei 30 °C inkubiert. Es wurden je 5 µl der Kultur auf einen mit 1 % (w/v) Agarose beschichteten Objektträger getropft und die Zellen mit Hilfe des „Axiovert 200M“ Fluoreszenzmikroskops, unter Verwendung der Software „Volocity“ (PERKINELMER; Version 5.0.3 und Version 5.2.1) mikroskopiert und mit der „ORCA-ER-1394“ CCD-Kamera fotografiert. Hierfür wurde ein 63 × Öl-Objektiv (NA 1,4) verwendet und die Zellen wurden sowohl im Hellfeld (HF), als auch unter Verwendung des CFP-Filterwürfels (Anregung 436 nm ± 5 nm, Emission 470 nm ± 20 nm) untersucht. Die Expositionszeit für den DIC Kanal

betrug 50 msec und der Verstärkungsfaktor (gain) 0. Für die Stämme, welche die P_{TEC1} -CFP* Reportergenkonstrukte trugen, wurde für den CFP-Kanal eine Expositionszeit von 200 msec und ein Verstärkungsfaktor von 0 verwendet. Für die Stämme, welche die P_{TEC1} -3 × $mTurquoise2$ * Reportergenkonstrukte trugen, wurde für den CFP-Kanal eine Expositionszeit von 400 msec und ein Verstärkungsfaktor von 0 verwendet. Es wurden von jedem Stamm sechs Bilder mit je 20 - 100 Zellen pro Bild aufgenommen.

5.10.2 Quantifizierung der Mikroskopie-Bilder (modifiziert nach Jungbluth et al., 2010)

Die Bildbearbeitung und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte unter Verwendung des Programms „ImageJ“ (Abràmoff et al., 2004; Schneider et al., 2012). Anhand des DIC Bildes wurde eine Suchmaske für die Zellen erstellt. Hierfür wurde zunächst mit dem Befehl „Find Edges“ in dem DIC Bild nach Bereichen gesucht, in denen es eine starke Änderung der Intensität gibt und dann der Kontrast durch den Befehl „Enhance Contrast“ erhöht. Durch Verwendung des „Gaussian Blur“-Filters wurde das Bild anschließend geglättet und mit Hilfe des Befehls „Make Binary“ in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt. Mit dem Befehl „Dilate“ wurden an den Kanten der Zellumrisse zusätzliche Pixel hinzugefügt, damit die Zellen vollständig umschlossen sind und die Zellen mit dem Befehl „Fill Holes“ ausgefüllt.

```

1.  open("F:\\Mikroskopie Sarah Weisser\\15.11.2013-TEC1P-CFP Klone 1\\TIFF\\YSW51-aF.tif");
2.  //run("Brightness/Contrast...");
3.  resetMinAndMax();
4.  run("Find Edges");
5.  run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
6.  run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
7.  run("Make Binary");
8.  run("Dilate")
9.  run("Dilate")
10. run("Fill Holes");
11. run("Erode");
12. run("Erode");
13. run("Create Selection");
14. open("F:\\Mikroskopie Sarah Weisser\\15.11.2013-TEC1P-CFP Klone 1\\TIFF\\YSW51-aF 2.tif");
15. run("Restore Selection");
16. run("Measure");
17. close();
18. close();

```

Abb. 35: Beispiel eines zur Quantifizierung verwendeten Makros.

Anschließend wurden mit dem Befehl „Erode“ die zuvor hinzugefügten Pixel von den Kanten der Zelumrisse wieder entfernt. Mit dem Befehl „Create Selection“ wurde dann eine Suchmaske für die Zelumrisse erstellt und über den Befehl „Restore Selection“ auf das Fluoreszenzbild gelegt. Die Fluoreszenz in den so identifizierten Zellen wurde mit Hilfe des Befehls „Measure“ gemessen. Hierbei wird die durchschnittliche Signalintensität des Bildes in Grauwerten angegeben. Für die Automatisierung dieser Schritte wurde ein Makro generiert, welches die gleichzeitige Messung aller sechs Bilder ermöglichte (Abb. 35).

Um die Signalstärke zu berechnen, wurde für jeden Stamm, sowie für die Kontrolle ohne Reportergen, der Mittelwert der sechs gemessenen Bilder bestimmt. In den Stämmen ohne Reportergen kann auch eine bestimmte Fluoreszenz gemessen werden. Sie wird als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet und setzt sich aus der Eigenfluoreszenz der Zellen, die sogenannte Autofluoreszenz, sowie der Fluoreszenz der Agarose zusammen. Anschließend wurde der erhaltene Mittelwert des Stammes ohne Reportergen von den Stämmen mit Reportergen abgezogen. Die relativen Signalintensitäten wurden in Prozent im Vergleich zu dem Stamm mit einem nativen *P_{TEC1}-CFP** bzw. *P_{TEC1}-3 × mTurquoise2** Reportergen in Abwesenheit von Pheromon für jedes Experiment berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert oder der Median und die Standardabweichung für jeden Stamm aus mindestens 3 Messungen berechnet.

5.10.3 Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar (Roberts and Fink, 1994)

Um die Adhäsion haploider *S. cerevisiae*-Stämme an Agar zu bestimmen, wurden die entsprechenden Stämme auf YEPD- oder SC-Festmedium mit den entsprechenden Supplementen mit Hilfe einer Impfschlinge ausgestrichen und für drei bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das totale Wachstum mit einer „Canon PowerShot A620“ Digitalkamera dokumentiert. Dann wurde die Platte mit einem leichten bis stringenten Strahl Wasser gewaschen. Hierbei lösen sich nicht adhäsive Zellen und werden weg gewaschen. Das Ergebnis (adhäsives Wachstum) wurde ebenfalls fotografisch dokumentiert.

5.10.4 Herstellung diploider *S. cerevisiae*-Stämme

Für die Herstellung diploider *TEC1/TEC1 S. cerevisiae*-Stämme, welche die verschiedenen *P_{TEC1}* Varianten tragen, wurden zunächst haploide *MAT α* -Stämme mit den entsprechenden Promotoren aus *MAT α* -Ausgangsstämmen (vergleiche Tab. 8) hergestellt. Hierfür wurde das Plasmid BHUM1159 (*P_{GAL}-HO*) in die haploiden *MAT α* -Stämme mit den *P_{TEC1}* Varianten transformiert. Für die Induktion der HO-Endonuklease, und den daraus resultierenden

Kreuzungstypwechsel, wurden Kulturen über Nacht in 2 ml YEPG-Medium bei 30 °C angezogen. Anschließend wurden 10 µl der Kultur mit 190 µl SC-Medium gemischt, der Ansatz auf SC-Festmedium ohne Uracil ausplattiert und die Platten für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf frischem SC-Festmedium ohne Uracil vereinzelt und der Geschlechtstyp der Kolonien mittels eines Paarungstest überprüft (vergleiche Kapitel 5.10.5). Es wurden für jeden Ausgangsstamm je zwei *MATa*-Stämme weiter verwendet. Um diploide *S. cerevisiae*-Stämme mit den *P_{TEC1}* Varianten zu erhalten, wurden die entsprechenden *MATa*- und *MATα*-Stämme auf YEPD-Festmedium miteinander gekreuzt und einen Tag bei 30 °C inkubiert. Dann wurde von jeder Kreuzung eine Vereinzelung auf YNB-Festmedium erstellt. Anschließend wurden die Kolonien zunächst auf YEPD und dann auf SC-Festmedium mit Uracil und 5-FOA überstrichen, um das *P_{GALI}-HO* Plasmid zu verlieren, welches das *URA3*-Gen als Selektionsmarker trägt. Das *URA3*-Gen codiert für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, welche 5-FOA in für *S. cerevisiae* tödliches 5-Fluoruracil umwandeln kann. Schließlich wurde der Geschlechtstyp der Kolonien mittels eines Paarungstest überprüft (vergleiche Kapitel 5.10.5) und je vier diploide *MATa/MATα*-Stämme für jede *P_{TEC1}* Variante für den Test auf Pseudohyphenbildung verwendet.

5.10.5 Paarungstest

Um den Geschlechtstyp von *S. cerevisiae*-Stämmen zu überprüfen, wurde ein Paarungstest durchgeführt. Hierfür wurden die zu überprüfenden *S. cerevisiae*-Stämme, sowie haploide und diploide Kontroll-Stämme mit den Teststämmen YHUM0069 (*MATa*) und YHUM0070 (*MATα*) auf YNB-Festmedium gekreuzt und für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die so erhaltenen Kolonien bestehen aus diploiden *MATa/MATα*-Zellen. Konnte der zu überprüfende Stamm weder mit dem *MATa*-, noch mit dem *MATα*-Teststamm paaren, handelte es sich hierbei um einen diploiden *MATa/MATα*-Stamm.

5.10.6 Test auf Pseudohyphenbildung (Gimeno et al., 1992)

Um den Einfluss der verschiedenen *P_{TEC1}* Varianten auf die Ausbildung von Pseudohyphen in diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen zu untersuchen, wurden die entsprechenden diploiden Hefestämme auf SLAD-Festmedium vereinzelt und für fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Die Ausbildung von Pseudohyphen wurde unter dem „Stemi 2000-C“ Stereomikroskop bei einer 5 × Vergrößerung untersucht und es wurden exemplarisch Bilder mit der „Canon PowerShot A620“ Digitalkamera bei 4 × optischem Zoom aufgenommen.

5.10.7 Halo-Assay

Um die α -Faktor-Sensitivität zu bestimmen, wurde ein Halo-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme in YEPD-Medium mit einem Gesamtvolumen von 5 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und für 2 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 100 μ l der Kultur auf einer YEPD-Platte ausplattiert. Es wurden jeweils 10 μ l α -Faktor (2 mM Stammlösung) oder Methanol auf Filterpapier aufgetropft und die Filterpapiere nach dem Trocknen auf den Platten mit den zu testenden Stämmen platziert. Die Ausbildung eines Hemmhofes (Halo) wurde nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C fotografisch dokumentiert.

5.11 Bioinformatische Promotoranalyse

Um die PREs und TCS-Elemente im *TEC1* Promotor zu identifizieren, wurde eine bioinformatische Analyse mit Hilfe der UniPROBE Datenbank (Hume et al., 2015) und der Yeasttract Datenbank (Teixeira et al., 2006; Monteiro et al., 2008; Abdulrehman et al., 2011; Teixeira et al., 2014) durchgeführt. Die UniPROBE Datenbank enthält Informationen über die *in vitro* DNA Bindungsspezifitäten von Proteinen, welche über sogenannte „Universal Protein Binding Microarrays“ (PBM) ermittelt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion für die Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren verwendet. Diese Funktion durchsucht die vom Benutzer eingegebene Sequenz nach putativen Bindestellen, indem sie nach Motiven sucht, welche in den PBM durch einen Transkriptionsfaktor gebunden wurden. Lag der Wert für die Anreicherung für eine bestimmte Sequenz über dem Schwellenwert von 0,45, wurde diese Sequenz als putative Bindestelle gewertet. In der Yeasttract Datenbank sind publizierte Assoziationen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren Zielgenen hinterlegt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion für die Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren verwendet. Hierbei wird in der vom Benutzer eingegebene Sequenz nach den Konsensussequenzen aller bereits beschriebenen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren gesucht.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulrehman, D., Monteiro, P.T., Teixeira, M.C., Mira, N.P., Lourenço, A.B., Dos Santos, S.C., Cabrito, T.R., Francisco, A.P., Madeira, S.C., Aires, Ricardo Santos, Oliveira, A.L., Sá-Correia, I., and Freitas, A.T.** (2011). YEASTRACT: Providing a programmatic access to curated transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae* through a web services interface. *Nucleic Acids Res.* **39**: 136–140.
- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., and Ram, S.J.** (2004). Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* **11**: 36–41.
- Aleksandrov, A., Schuldt, L., Hinrichs, W., and Simonson, T.** (2008). Tet Repressor Induction by Tetracycline: A Molecular Dynamics, Continuum Electrostatics, and Crystallographic Study. *J. Mol. Biol.* **378**: 896–912.
- Alon, U.** (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 450–461.
- Anbanandam, A., Albarado, D.C., Nguyen, C.T., Halder, G., Gao, X., and Veeraraghavan, S.** (2006). Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 17225–17230.
- Andrianopoulos, A. and Timberlake, W.E.** (1991). ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**: 747–748.
- Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L.A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S.M., Dymond, J.S., Kuang, Z., Scheifele, L.Z., Cooper, E.M., Cai, Y., Zeller, K., Agmon, N., Han, J.S., Hadjithomas, M., Tullman, J., Caravelli, K., Cirelli, K., Guo, Z., London, V., Yeluru, A., Murugan, S., Kandavelou, K., Agier, N., Fischer, G., Yang, K., Martin, J.A., Bilgel, M., Bohutskyi, P., Boulter, K.M., Capaldo, B.J., Chang, J., Charoen, K., Choi, W.J., Deng, P., DiCarlo, J.E., Doong, J., Dunn, J., Feinberg, J.I., Fernandez, C., Floria, C.E., Gladowski, D., Hadidi, P., Ishizuka, I., Jabbari, J., Lau, C.Y.L., Lee, P.A., Li, S., Lin, D., Linder, M.E., Ling, J., Liu, J.J., London, M., Ma, H., Mao, J., McDade, J.E., McMillan, A., Moore, Aaron M., Oh, W.C., Ouyang, Y., Patel, R., Paul, M., Paulsen, L.C., Qiu, J. Rhee, A., Rubashkin, M.G., Soh, I.Y., Sotuyo, N.E., Srinivas, V., Suarez, A., Wong, A., Wong, R., Xie, W.R., Xu, Y., Yu, A.T., Koszul, R., Bader, J.S., Boeke, J.D., and Chandrasegaran, S.** (2014). Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science.* **344**: 55–58.
- Arndt, K.T., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1989). A suppressor of a *HIS4* transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* **56**: 527–537.
- Van Arsdell, S.W., Stetler, G.L., and Thorner, J.** (1987). The yeast repeated element sigma contains a hormone-inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 749–759.
- Ash, J., Wu, C., Larocque, R., Jamal, M., Stevens, W., Osborne, M., Thomas, D.Y., and Whiteway, M.** (2003). Genetic analysis of the interface between Cdc42p and the CRIB domain of Ste20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 9–20.

- Babu, M.M., Luscombe, N.M., Aravind, L., Gerstein, M., and Teichmann, S.A.** (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 283–291.
- Bacon, J.S.D., Davidson, E.D., Jones, D., and Taylor, I.F.** (1966). The location of chitin in the yeast cell wall. *Biochem. J.* **101**: 36C–38C.
- Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates III, J.R., and Madhani, H.D.** (2004). Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**: 991–1000.
- Bao, M.Z., Shock, T.R., and Madhani, H.D.** (2010). Multisite phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth regulator Tec1 is required for its recognition by the E3 ubiquitin ligase adaptor Cdc4 and its subsequent destruction *in vivo*. *Eukaryot. Cell* **9**: 31–36.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N.** (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* **7**: 25–42.
- Bardwell, L.** (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **25**: 1465–1476.
- Bardwell, L., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R., and Thorner, J.** (1998a). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* **12**: 2887–2898.
- Bardwell, L., Cook, J.G., Zhu-Shimoni, J.X., Voora, D., and Thorner, J.** (1998b). Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 15400–15405.
- Barton, A.A.** (1950). Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **4**: 84–86.
- Battle, M., Lu, A., Green, D.A., Xue, Y., and Hirsch, J.P.** (2003). Krh1p and Krh2p act downstream of the Gpa2p G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth. *J. Cell Sci.* **116**: 701–71.
- Bauer, F.F., Govender, P., and Bester, M.C.** (2010). Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**: 31–39.
- Baumeister, R., Helbl, V., and Hillen, W.** (1992). Contacts between Tet repressor and tet operator revealed by new recognition specificities of single amino acid replacement mutants. *J. Mol. Biol.* **226**: 1257–1270.
- Baur, M., Esch, R.K., and Errede, B.** (1997). Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4330–4337.

- Beck, T. and Hall, M.N.** (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689–692.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E.** (1998). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **26**: 942–947.
- Bender, A. and Sprague, G.F.** (1987). MAT alpha 1 protein, a yeast transcription activator, binds synergistically with a second protein to a set of cell-type-specific genes. *Cell* **50**: 681–691.
- Bennett, J. and Scott, K.J.** (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **43**: 173–182.
- Bimboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523.
- Birke, R.** (2005). Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Tec1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Blumer, K.J., Reneke, J.E., and Thorner, J.** (1988). The *STE2* gene product is the ligand-binding component of the alpha-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 10836–10842.
- Blumer, K.J. and Thorner, J.** (1991). Receptor-G protein signaling in yeast. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 37–57.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395–1401.
- Borneman, A.R., Gianoulis, T.A., Zhang, Z.D., Yu, H., Rozowsky, J., Seringhaus, M.R., Wang, L.Y., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2007). Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**: 815–9.
- Borneman, A.R., Leigh-Bell, J.A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2006). Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes Dev.* **20**: 435–448.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., and Young, R.A.** (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947–56.
- Braus, G.H., Grundmann, O., Brückner, S., and Mösch, H.-U.** (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**: 4272–4284.
- Brückner, S.** (2007). Regulation des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1 durch die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade und den TOR-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.

- Brückner, S., Kern, S., Birke, R., Saugar, I., Ulrich, H.D., and Mösch, H.U.** (2011). The TEA transcription factor Tec1 links TOR and MAPK pathways to coordinate yeast development. *Genetics* **189**: 479–494.
- Brückner, S., Köhler, T., Braus, G.H., Heise, B., Bolte, M., and Mösch, H.U.** (2004). Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr. Genet.* **46**: 331–342.
- Brückner, S. and Mösch, H.U.** (2012). Choosing the right lifestyle: Adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 25–58.
- Bücking-Throm, E., Duntze, W., Hartwell, L.H., and Manney, T.R.** (1973). Reversible arrest of haploid yeast cells at the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. *Exp. Cell Res.* **76**: 99–110.
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J.S., Deminoff, S.J., and Herman, P.K.** (2005). An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 13933–13938.
- Bürglin, T.R.** (1991). The TEA domain: A novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**: 11–12.
- Butty, A.C., Pryciak, P.M., Huang, L.S., Herskowitz, I., and Peter, M.** (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* **282**: 1511–1516.
- Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P.** (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6012–6023.
- Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M., and Chovnick, A.** (1992). The *scalloped* gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* **6**: 367–379.
- Carlson, M.** (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 202–207.
- Cavalieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., and Polsinelli, M.** (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *J. Mol. Evol.* **57**: 226–232.
- Celenza, J.L., Eng, F.J., and Carlson, M.** (1989). Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5045–5054.
- Chang, F. and Herskowitz, I.** (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: *FAR1* is an inhibitor of a G1 cyclin, *CLN2*. *Cell* **63**: 999–1011.
- Chen, R.E. and Thorner, J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 1311–1340.

- Cherkasova, V., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G.** (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol. Cell. Biol.* **30**: 2862–2873.
- Cherkasova, V.A. and Hinnebusch, A.G.** (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes Dev.* **17**: 859–872.
- Chou, S., Huang, L., and Liu, H.** (2004). Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF^{Cdc4} determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* **119**: 981–990.
- Chou, S., Lane, S., and Liu, H.** (2006). Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 4794–4805.
- Colombo, S., Ronchetti, D., Thevelein, J.M., Winderickx, J., and Martegani, E.** (2004). Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 46715–46722.
- Di Como, C.J. and Arndt, K.T.** (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* **10**: 1904–1916.
- Connelly, C. and Hieter, P.** (1996). Budding yeast *SKP1* encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* **86**: 275–285.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., and Thevelein, J.M.** (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 254–299.
- Cook, J.G., Bardwell, L., Kron, S.J., and Thorner, J.** (1996). Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**: 2831–2848.
- Cook, J.G., Bardwell, L., and Thorner, J.** (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85–88.
- Coschigano, P.W. and Magasanik, B.** (1991). The *URE2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 822–832.
- Cross, F.R. and Tinkelenberg, A.H.** (1991). A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875–883.
- Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A.** (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 35347–35354.
- Cullen, P.J., Sabbagh, W., Graham, E., Irick, M.M., Van Olden, E.K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague, G.F.** (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.* **18**: 1695–1708.

- Cullen, P.J. and Sprague, G.F.** (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 13619–13624.
- Cullen, P.J. and Sprague, G.F.** (2012). The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* **190**: 23–49.
- Cutler, N.S., Pan, X., Heitman, J., and Cardenas, M.E.** (2001). The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell* **12**: 4103–4113.
- Davenport, K.D., Williams, K.E., Ullmann, B.D., and Gustin, M.C.** (1999). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**: 1091–1103.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G.A., and Hillen, W.** (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: Determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1591–1595.
- Deshpande, N., Chopra, A., Rangarajan, A., Shashidhara, L.S., Rodrigues, V., and Krishna, S.** (1997). The human transcription enhancer factor-1, TEF-1, can substitute for *Drosophila scalloped* during wingblade development. *J. Biol. Chem.* **272**: 10664–10668.
- Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G.** (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell* **68**: 585–596.
- Dickinson, J.R.** (1996). “Fusel” alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* **142**: 1391–1397.
- Dickinson, J.R.** (1994). Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 99–103.
- Dohlman, H.G.** (2002). G proteins and pheromone signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 129–152.
- Dolan, J.W., Kirkman, C., and Fields, S.** (1989). The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 5703–5707.
- Donaton, M.C. V, Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., and Thevelein, J.M.** (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 911–929.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G.** (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell* **6**: 269–279.
- Douglas, L.J.** (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30–36.

- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127–6145.
- Duntze, W., MacKay, V., and Manney, T.R.** (1970). *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science* **168**: 1472–1473.
- Elion, E.A., Satterberg, B., and Kranz, J.E.** (1993). FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell* **4**: 495–510.
- Errede, B. and Ammerer, G.** (1989). STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes Dev.* **3**: 1349–1361.
- Errede, B., Gartner, A., Zhou, Z., Nasmyth, K., and Ammerer, G.** (1993). MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 *in vitro*. *Nature* **362**: 261–264.
- Esch, R.K., Wang, Y., and Errede, B.** (2006). Pheromone-induced degradation of Ste12 contributes to signal attenuation and the specificity of developmental fate. *Eukaryot. Cell* **5**: 2147–2160.
- Esposito, R.E. and Klapholtz, S.** (1981). Meiosis and Ascospore Development. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.), pp. 211–287.
- Farrance, I.K.G. and Ordahl, C.P.** (1996). The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J. Biol. Chem.* **271**: 8266–8274.
- van der Felden, J.** (2012). Mechanismen zur Steuerung transkriptioneller Programme für Wachstum und Differenzierung durch den TEA-Regulator Tec1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- van der Felden, J., Weisser, S., Brückner, S., Lenz, P., and Mösch, H.-U.** (2014). The transcription factors Tec1 and Ste12 interact with coregulators Msa1 and Msa2 to activate adhesion and multicellular development. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 2283–93.
- Feng, Y., Song, L.Y., Kincaid, E., Mahanty, S.K., and Elion, E.A.** (1998). Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr. Biol.* **8**: 267–278.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., and Käppeli, O.** (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physiol.* **22**: 123–183.
- Fields, S. and Herskowitz, I.** (1985). The yeast *STE12* product is required for expression of two sets of cell-type-specific genes. *Cell* **42**: 923–930.
- Freifelder, D.** (1960). Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **80**: 567–568.
- Fries, S.J.** (2012). Analyse der Fus3 / Kss1-MAPK-Aktivität in der Bäckerhefe in einem *in vivo* System. Bachelorarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.

- Gagiano, M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S.** (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2**: 433–470.
- Gagiano, M., Van Dyk, D., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S.** (1999). Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31**: 103–116.
- Gancedo, J.M.** (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 107–123.
- Gancedo, J.M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334–361.
- Garben, N.** (2013). *In vivo* Analyse der *TEC1*-Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Garí, E., Piedrafitá, L., Aldea, M., and Herrero, E.** (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 837–848.
- Garner, M.M. and Revzin, A.** (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: Application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**: 3047–3060.
- Gartner, A., Nasmyth, K., and Ammerer, G.** (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* **6**: 1280–1292.
- Gavrias, V., Andrianopoulos, A., Gimeno, C.J., and Timberlake, W.E.** (1996). *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol. Microbiol.* **19**: 1255–1263.
- Ghaemmaghani, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741.
- Gietz, R.D. and Sugino, A.** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527–534.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R.** (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2100–2112.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R.** (1992). The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science*. **257**: 626.

- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077–1090.
- Giots, F., Donaton, M.C.V., and Thevelein, J.M.** (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1163–1181.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G.** (1996). Life with 6000 Genes. *Science*. **274**: 546–567.
- Goossens, A., Dever, T.E., Pascual-Ahuir, A., and Serrano, R.** (2001). The Protein Kinase Gcn2p Mediates Sodium Toxicity in Yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 30753–30760.
- Gossen, M. and Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 5547–5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., and Bujard, H.** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. **268**: 1766–1769.
- Hackett, E.A., Esch, R.K., Maleri, S., and Errede, B.** (2006). A family of destabilized cyan fluorescent proteins as transcriptional reporters in *S. cerevisiae*. *Yeast* **23**: 333–349.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G., and Sprague, G.F.** (1986). Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 1418–1422.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G., and Sprague, G.F.** (1991). Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2952–2961.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M.E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A., and Carroll, S.** (1998). The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**: 3900–3909.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R.** (2004). Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**: 405–415.
- Hamann, L., Buß, H., and Tannich, E.** (1997). Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**: 83–91.
- Harashima, T. and Heitman, J.** (2002). The Gα protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic Gβ subunits. *Mol. Cell* **10**: 163–173.

- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.-B., Reynolds, D.B., Yoo, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, D.K., Kellis, M., Rolfe, P.A., Takusagawa, K.T., Lander, E.S., Gifford, D.K., Fraenkel, E., and Young, R.A.** (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99–104.
- Hartwell, L.H.** (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38**: 164–198.
- Hasek, J., Rupes, I., Svobodová, J., and Streiblová, E.** (1987). Tubulin and actin topology during zygote formation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3355–3363.
- Heise, B., van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S., and Mösch, H.-U.** (2010). The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot. Cell* **9**: 514–531.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905–909.
- Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M.N.** (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* **5**: 105–118.
- Hengge-Aronis, R.** (1993). Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**: 165–168.
- Herskowitz, I. and Jensen, R.E.** (1991). Putting the *HO* gene to work: Practical uses for mating-type switching. *Methods Enzymol.* **194**: 132–146.
- Hicks, J.B., Strathern, J.N., and Herskowitz, I.** (1977). Interconversion of yeast mating types. III. Action of the homothallism (*HO*) gene in cells homozygous for the mating type locus. *Genetics* **85**: 395–405.
- Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K., and Meier, I.** (1983). Control of expression of the *Tn10*-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J. Mol. Biol.* **169**: 707–721.
- Hilton, J.L., Kearney, P.C., and Ames, B.N.** (1965). Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole(amitrole): inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**: 544–547.
- Hinnebusch, A.G.** (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248–273.
- Hinnebusch, A.G.** (2005). Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 407–450.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, A., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W.** (1994). Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*. **264**: 418–420.

- Hirschman, J.E. and Jenness, D.D.** (1999). Dual lipid modification of the yeast G gamma subunit Ste18p determines membrane localization of G beta gamma. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7705–7711.
- Hirschman, J.E., De Zutter, G.S., Simonds, W.F., and Jenness, D.D.** (1997). The G beta gamma complex of the yeast pheromone response pathway. Subcellular fractionation and protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **272**: 240–248.
- Hoffman, C.S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–272.
- Hoi, J.W.S. and Dumas, B.** (2010). Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryot. Cell* **9**: 480–485.
- Hoi, J.W.S., Herbert, C., Bacha, N., O’Connell, R., Lafitte, C., Borderies, G., Rossignol, M., Rougé, P., and Dumas, B.** (2007). Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol. Microbiol.* **64**: 68–82.
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M.** (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 8839–8843.
- Hope, I.A. and Struhl, K.** (1985). GCN4 protein, synthesized *in vitro*, binds *HIS3* regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell* **43**: 177–188.
- Hsu, D.K.W., Guo, Y., Alberts, G.F., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Peifley, K.A., and Winkles, J.A.** (1996). Identification of a murine TEF-1-related gene expressed after mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts and during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **271**: 13786–13795.
- Hume, M.A., Barrera, L.A., Gisselbrecht, S.S., and Bulyk, M.L.** (2015). UniPROBE, update 2015: new tools and content for the online database of protein-binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **43**: D117–D122.
- Hwang-Shum, J.-J., Hagen, D.C., Jarvis, E.E., Westby, C.A., and Sprague, G.F.** (1991). Relative contributions of MCM1 and STE12 to transcriptional activation of a- and alpha-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 197–204.
- Ishiji, T., Lace, M.J., Parkkinen, S., Anderson, R.D., Haugen, T.H., Cripe, T.P., Xiao, J.H., Davidson, I., Chambon, P., and Turek, L.P.** (1992). Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 *E6* and *E7* oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* **11**: 2271–2281.
- Ishizuka, H., Hanamura, A., Inada, T., and Aiba, H.** (1994). Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *EMBO J.* **13**: 3077–3082.

- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T., and Hall, M.N.** (2001). TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* **8**: 1017–1026.
- Jacquemin, P., Hwang, J.J., Martial, J.A., Dollé, P., and Davidson, I.** (1996). A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**: 21775–21785.
- Jacquemin, P., Martial, J.A., and Davidson, I.** (1997). Human TEF-5 is preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-B gene enhancer. *J. Biol. Chem.* **272**: 12928–12937.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M.** (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–962.
- Jansen, G., Bühring, F., Hollenberg, C.P., and Ramezani Rad, M.** (2001). Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. genomics* **265**: 102–117.
- Jenness, D.D., Burkholder, A.C., and Hartwell, L.H.** (1983). Binding of alpha-factor pheromone to yeast cells: chemical and genetic evidence for an alpha-factor receptor. *Cell* **35**: 521–529.
- Jiang, R. and Carlson, M.** (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**: 3105–3115.
- Jiang, R. and Carlson, M.** (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2099–2106.
- Jiang, S.-W., Wu, K., and Eberhardt, N.L.** (1999). Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Mol. Endocrinol.* **13**: 879–889.
- Jiang, Y. and Broach, J.R.** (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* **18**: 2782–2792.
- Jungbluth, M., Renicke, C., and Taxis, C.** (2010). Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst. Biol.* **4**: 1–12.
- Karunanithi, S. and Cullen, P.J.** (2012). The filamentous growth MAPK pathway responds to glucose starvation through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**: 869–887.
- Kataoka, T., Broek, D., and Wigler, M.** (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**: 493–505.
- Keith, C.T. and Schreiber, S.L.** (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* **270**: 50–51.

- Kern, S.** (2011). Kernimport des TEAD-Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Kiel, C., Yus, E., and Serrano, L.** (2010). Engineering signal transduction pathways. *Cell* **140**: 33–47.
- Kim, J. and Guan, K.-L.** (2011). Amino acid signaling in TOR activation. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 1001–1032.
- Kirkman-Correia, C., Stroke, I.L., and Fields, S.** (1993). Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3765–3772.
- Kleckner, N., Chan, R.K., Tye, B.-K., and Botstein, D.** (1975). Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *J. Mol. Biol.* **97**: 561–575.
- Klein, S., Reuveni, H., and Levitzki, A.** (2000). Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3219–3223.
- Kleinschmidt, M., Grundmann, O., Blüthgen, N., Mösch, H.-U., and Braus, G.H.** (2005). Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* cells under adhesion-inducing conditions. *Mol. Genet. Genomics* **273**: 382–393.
- Klotkowski, T. and Wiater, A.** (1965). Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**: 562–566.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E.** (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963–972.
- Köhler, T., Wesche, S., Taheri, N., Braus, G.H., and Mösch, H.-U.** (2002). Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot. Cell* **1**: 673–686.
- Kojic, E.M. and Darouiche, R.O.** (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 255–267.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W.R.H., Donaton, M.C. V, Van Dijck, P., Winderickx, J., De Winde, J.H., and Thevelein, J.M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**: 1002–1012.
- Kron, S.J. and Gow, N.A.R.** (1995). Budding yeast morphogenesis: Signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 845–855.
- Kron, S.J., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **5**: 1003–1022.

- Kronstad, J.W., Holly, J.A., and MacKay, V.L.** (1987). A yeast operator overlaps an upstream activation site. *Cell* **50**: 369–377.
- Kübler, E., Mösch, H.-U., Rupp, S., and Lisanti, M.P.** (1997). Gpa2p, a G-protein α -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**: 20321–20323.
- Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T., and Ito, T.** (2003). Rapamycin-induced translational derepression of *GCN4* mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 α kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* **278**: 20457–20460.
- Kuchin, S., Vyas, V.K., and Carlson, M.** (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 3994–4000.
- Kumar, C.G. and Anand, S.K.** (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 9–27.
- Kuriyama, H. and Slaughter, J.C.** (1995). Control of cell morphology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by nutrient limitation in continuous culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 37–40.
- Kurjan, J. and Herskowitz, I.** (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell* **30**: 933–943.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin, M., and Jacobs, E.** (1990). *TEC1*, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3541–3550.
- Lamson, R.E., Winters, M.J., and Pryciak, P.M.** (2002). Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2939–2951.
- Lee, T.I. et al.** (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**: 799–804.
- Leech, A., Nath, N., McCartney, R.R., and Schmidt, M.C.** (2003). Isolation of mutations in the catalytic domain of the Snf1 kinase that render its activity independent of the Snf4 subunit. *Eukaryot. Cell* **2**: 265–273.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., Thomas, D.Y., and Leberer, E.** (1998). Interaction of a G-protein β -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**: 191–195.
- Lemaire, K., Van De Velde, S., Van Dijck, P., and Thevelein, J.M.** (2004). Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **16**: 293–299.

- Leslie, D.M., Grill, B., Rout, M.P., Wozniak, R.W., and Aitchison, J.D.** (2002). Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2544–2555.
- Levi, J.D.** (1956). Mating Reaction in Yeast. *Nature* **177**: 753–754.
- Li, H. and Johnson, A.D.** (2010). Evolution of transcription networks-lessons from yeasts. *Curr. Biol.* **20**: R746–753.
- Liu, H., Köhler, J., and Fink, G.R.** (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723–1726.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741–1744.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1992). SHR3: A novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* **71**: 463–478.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R.** (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939–949.
- Lo, T.L., Qu, Y., Uwamahoro, N., Quenault, T., Beilharz, T.H., and Traven, A.** (2012). The mRNA decay pathway regulates the expression of the *FLO11* adhesin and biofilm formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 1387–1391.
- Lo, W.S. and Dranginis, A.M.** (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**: 161–171.
- Loewith, R. and Hall, M.N.** (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**: 1177–1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N.** (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**: 457–468.
- Lorenz, M.C., Cutler, N.S., and Heitman, J.** (2000a). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**: 183–199.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J.** (1998a). Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* **150**: 1443–1457.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J.** (1998b). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 1236–1247.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J.** (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *EMBO J.* **16**: 7008–7018.

- Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P., and Heitman, J.** (2000b). The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 609–622.
- Ludin, K., Jiang, R., and Carlson, M.** (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6245–6250.
- Luke, M.M., Della Seta, F., Di Como, C.J., Sugimoto, H., Kobayashi, R., and Arndt, K.T.** (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2744–2755.
- Ma, D., Cook, J.G., and Thorner, J.** (1995). Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol. Biol. Cell* **6**: 889–909.
- MacIsaac, K.D., Wang, T., Gordon, D.B., Gifford, D.K., Stormo, G.D., and Fraenkel, E.** (2006). An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 113.
- Mackay, V. and Manney, T.R.** (1974). Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics* **76**: 255–271.
- Madhani, H.D.** (2007). *From a to alpha Yeast as a Model for Cellular Differentiation* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Madhani, H.D. and Fink, G.R.** (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314–1317.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673–684.
- Maeda, Y.T. and Sano, M.** (2006). Regulatory dynamics of synthetic gene networks with positive feedback. *J. Mol. Biol.* **359**: 1107–24.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.-M., Raymond, M., and Magee, P.T.** (2002). Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **46**: 1345–1351.
- Malcher, M., Schladebeck, S., and Mösch, H.-U.** (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717–730.
- Manahan, C.L., Patnana, M., Blumer, K.J., and Linder, M.E.** (2000). Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**: 957–968.

- Mandel, M. and Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159–162.
- Mar, J.H. and Ordahl, C.P.** (1990). M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4271–4283.
- Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., and Keasling, J.D.** (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* **21**: 796–802.
- Marzluf, G.A.** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 17–32.
- Matsuo, R., Kubota, H., Obata, T., Kito, K., Ota, K., Kitazono, T., Ibayashi, S., Sasaki, T., Iida, M., and Ito, T.** (2005). The yeast eIF4E-associated protein Eap1p attenuates *GCN4* translation upon TOR-inactivation. *FEBS Lett.* **579**: 2433–2438.
- McCaffrey, G., Clay, F.J., Kelsay, K., and Sprague, G.F.** (1987). Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2680–2690.
- McCartney, R.R. and Schmidt, M.C.** (2001). Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* **276**: 36460–36466.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.-S., Cheng, G., Zhao, Z., and Wang, C.** (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 17593–17598.
- McMaster, G.K. and Carmichael, G.G.** (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 4835–4838.
- Milo, R., Shen-Orr, S., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Chklovskii, D., and Alon, U.** (2002). Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* **298**: 824–827.
- Mirabito, P.M., Adams, T.H., and Timberlake, W.E.** (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859–868.
- Monds, R.D. and O'Toole, G.A.** (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **17**: 73–87.
- Monteiro, P.T., Mendes, N.D., Teixeira, M.C., D'Orey, S., Tenreiro, S., Mira, N.P., Pais, H., Francisco, A.P., Carvalho, A.M., Lourenço, A.B., Sá-Correia, I., Oliveira, A.I., and Freitas, A.T.** (2008). YEASTRACT-DISCOVERER: New tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **36**: D132–D136.

- Moriyoshi, K.** (2009). pBT, a novel vector for tetracycline-regulated yeast three-hybrid assay. *Nucleic Acids Res.* **37**: 1–8.
- Mösch, H.-U.** (2000). Pseudohyphal development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Contrib. Microbiol.* **5**: 185–200.
- Mösch, H.-U. and Fink, G.R.** (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**: 671–684.
- Mösch, H.U., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G.R., and Braus, G.H.** (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1325–1335.
- Mösch, H.-U., Roberts, R.L., and Fink, G.R.** (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 5352–5356.
- Mrak, E.M. and Phaff, H.J.** (1948). Yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **2**: 1–46.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273.
- Murphy, K.F., Balázsi, G., and Collins, J.J.** (2007). Combinatorial promoter design for engineering noisy gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 12726–12731.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K.-I., Matsumoto, K., and Kaziro, Y.** (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (*GPA2*) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 1374–1378.
- Nath, N., McCartney, R.R., and Schmidt, M.C.** (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 3909–3917.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Sniegowski, P.D.** (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Can. J. Microbiol.* **44**: 1045–1050.
- Neiman, A.M. and Herskowitz, I.** (1994). Reconstitution of a yeast protein kinase cascade *in vitro*: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 3398–3402.
- Neklesa, T.K. and Davis, R.W.** (2009). A genome-wide screen for regulators of TORC1 in response to amino acid starvation reveals a conserved Npr2/3 complex. *PLoS Genet.* **5**: e1000515.
- Nern, A. and Arkowitz, R.A.** (1999). A Cdc24p-Far1p-G beta gamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J. Cell Biol.* **144**: 1187–1202.

- Niederberger, P., Miozzari, G., and Hütter, R.** (1981). Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 584–593.
- Nikawa, J.-I., Sass, P., and Wigler, M.** (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3629–3636.
- Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourencço, A., Quintino, E., Versele, M., and Thevelein, J.M.** (2006). Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol. Microbiol.* **59**: 1485–1505.
- Oehlen, L. and Cross, F.R.** (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of *TEC1*, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **429**: 83–88.
- Oliphant, A.R., Brandl, C.J., and Struhl, K.** (1989). Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2944–2949.
- Olson, K.A., Nelson, C., Tai, G., Hung, W., Yong, C., Astell, C., and Sadowski, I.** (2000). Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-responsive transcription by separate mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4199–4209.
- Palecek, S.P., Parikh, A.S., Huh, J.H., and Kron, S.J.** (2002). Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Mol. Microbiol.* **45**: 453–469.
- Pan, X. and Heitman, J.** (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4874–4887.
- Pan, X. and Heitman, J.** (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 8364–8372.
- Park, S.H., Koh, S.S., Chun, J.H., Hwang, H.J., and Kang, H.S.** (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STA1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2044–2050.
- Peter, M. and Herskowitz, I.** (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**: 1228–1231.
- Petrovič, U.** (2015). Next-generation biofuels: a new challenge for yeast. *Yeast* **Epub ahead**.
- Pi, H., Chien, C.-T., and Fields, S.** (1997). Transcriptional activation upon pheromone stimulation mediated by a small domain of *Saccharomyces cerevisiae* Ste12p. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6410–6418.

- Pitoniak, A., Chavel, C.A., Chow, J., Smith, J., Camara, D., Karunanithi, S., Li, B., Wolfe, K.H., and Cullen, P.J.** (2015). Cdc42p-interacting protein Bem4p regulates the filamentous-growth mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **35**: 417–436.
- Primig, M., Winkler, H., and Ammerer, G.** (1991). The DNA binding and oligomerization domain of MCM1 is sufficient for its interaction with other regulatory proteins. *EMBO J.* **10**: 4209–4218.
- Prinz, S., Aldridge, C., Ramsey, S.A., Taylor, R.J., and Galitski, T.** (2007). Control of signaling in a MAP-kinase pathway by an RNA-binding protein. *PLoS One* **2**: e249.
- Pryciak, P.M. and Huntress, F.A.** (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G beta gamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev.* **12**: 2684–2697.
- Qiu, H., Dong, J., Hu, C., Francklyn, C.S., and Hinnebusch, A.G.** (2001). The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J.* **20**: 1425–1438.
- Raithatha, S., Su, T.-C., Lourenco, P., Goto, S., and Sadowski, I.** (2012). Cdk8 Regulates Stability of the Transcription Factor Phd1 To Control Pseudohyphal Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 664–674.
- Ramezani Rad, M., Jansen, G., Bühring, F., and Hollenberg, C.P.** (1998). Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 29–38.
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., and Powers, T.** (2004). TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**: 14752–14762.
- Rhee, H.S. and Pugh, B.F.** (2011). Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* **147**: 1408–1419.
- Riezman, H., Hase, T., van Loon, A.P.G.M., Grivell, L.A., Suda, K., and Schatz, G.** (1983). Import of proteins into mitochondria: a 70 kilodalton outer membrane protein with a large carboxy-terminal deletion is still transported to the outer membrane. *EMBO J.* **2**: 2161–2168.
- Roberts, R.L. and Fink, G.R.** (1994). Elements of a single map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**: 2974–2985.
- Robertson, L.S. and Fink, G.R.** (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 13783–13787.
- Rohde, J.R., Campbell, S., Zurita-Martinez, S.A., Cutler, N.S., Ashe, M., and Cardenas, M.E.** (2004). TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 8332–8341.

- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., and Winderickx, J.** (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* **38**: 348–358.
- Romero-Santacreu, L., Orozco, H., Garre, E., and Alepuz, P.** (2010). The bidirectional cytomegalovirus immediate/early promoter is regulated by Hog1 and the stress transcription factors Sko1 and Hot1 in yeast. *Mol. Genet. Genomics* **283**: 511–518.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H., and Fink, G.** (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* **18**: 1257–1269.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 5463–5467.
- Santhanam, A., Hartley, A., Düvel, K., Broach, J.R., and Garrett, S.** (2004). PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot. Cell* **3**: 1261–1271.
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., and Wigler, M.** (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 9303–9307.
- Schleif, R.** (2000). Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends Genet.* **16**: 559–565.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D.E., and Hall, M.N.** (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 338–351.
- Schmitz, G.F.** (2014). Herstellung von destabilisierten Fluorophor-Reportern zur Untersuchung der Oberflächenwahrnehmung von *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671–675.
- Ter Schure, E.G., Van Riel, N.A.W., and Verrips, C.T.** (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 67–83.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Röllinghoff, M., and Schröppel, K.** (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **38**: 435–445.
- Seibel, N.M., Eljouni, J., Nalaskowski, M.M., and Hampe, W.** (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* **368**: 95–99.

- Sengupta, P. and Cochran, B.H.** (1991). MAT alpha 1 can mediate gene activation by a mating factor. *Genes Dev.* **5**: 1924–1934.
- Shen-Orr, S.S., Milo, R., Mangan, S., and Alon, U.** (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **31**: 64–68.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B.** (1986). *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Shirra, M.K., McCartney, R.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Schmidt, M.C., and Arndt, K.M.** (2008). A chemical genomics study identifies Snf1 as a repressor of *GCN4* translation. *J. Biol. Chem.* **283**: 35889–35898.
- Shock, T.R., Thompson, J., Yates, J.R., and Madhani, H.D.** (2009). Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryot. Cell* **8**: 606–616.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19–27.
- Simon, M.-N., De Virgilio, C., Souza, B., Pringle, J.R., Abo, A., and Reed, S.I.** (1995). Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature* **376**: 702–705.
- Singh, P., Ganesan, K., Malathi, K., Ghosh, D., and Datta, A.** (1994). *ACPR*, a *STE12* homologue from *Candida albicans*, is a strong inducer of pseudohyphae in *Saccharomyces cerevisiae* haploids and diploids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 1079–1085.
- Sizemore, C., Wissmann, A., Gülland, U., and Hillen, W.** (1990). Quantitative analysis of Tn10 Tet repressor binding to a complete set of tet operator mutants. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2875–2880.
- Soares, E. V.** (2011). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *J. Appl. Microbiol.* **110**: 1–18.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503–517.
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., and Cavalieri, D.** (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 13398–13403.
- Streiblová, E.** (1970). Study of scar formation in the life cycle of heterothallic *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **16**: 827–831.
- Su, T.-C., Tamarkina, E., and Sadowski, I.** (2010). Organizational constraints on Ste12 *cis*-elements for a pheromone response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **277**: 3235–3248.

- Suoranta, K. and Londesborough, J.** (1984). Purification of intact and nicked forms of a zinc-containing, Mg²⁺-dependent, low K(m) cyclic AMP phosphodiesterase from bakers' yeast. *J. Biol. Chem.* **259**: 6964–6971.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J.R., Schmidt, M.C., and Hardie, D.G.** (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* **13**: 1299–1305.
- Tanaka, K., Matsumoto, K., and Toh-E, A.** (1989). *IRA1*, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 757–768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Satoh, T., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., Matsumoto, K., Kaziro, Y., and Toh-e, A.** (1990). *S. cerevisiae* genes *IRA1* and *IRA2* encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell* **60**: 803–807.
- Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K., and Tyers, M.** (1997). Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr. Biol.* **7**: 228–238.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P.T., Guerreiro, J.F., Gonçalves, J.P., Mira, N.P., Dos Santos, S.C., Cabrito, T.R., Palma, M., Costa, C., Francisco, A.P., Madeira, S.C., Oliveira, A.L., Freitas, A.T., and Sá-Correia, I.** (2014). The YEASTRACT database: An upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **42**: D161–D166.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sá-Correia, I.** (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **34**: D446–D451.
- Tesfaigzi, J., Smith-Harrison, W., and Carlson, D.M.** (1994). A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* **17**: 268–269.
- Thevelein, J.M. and De Winder, J.H.** (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **33**: 904–918.
- Thieffry, D., Huerta, A.M., Pérez-Rueda, E., and Collado-Vides, J.** (1998). From specific gene regulation to genomic networks: a global analysis of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Bioessays* **20**: 433–40.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., and Wigler, M.** (1987a). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1371–1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M.** (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**: 277–287.

- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., and Wigler, M.** (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**: 27–36.
- Tøttrup, H. V and Carlsen, S.** (1990). A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 339–348.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 4350–4354.
- Trueheart, J., Boeke, J.D., and Fink, G.R.** (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2316–2328.
- Tu, J. and Carlson, M.** (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 5939–5946.
- Urban, J., Souldard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N., and Loewith, R.** (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **26**: 663–674.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D.S., Nickerson, S.R., Krysan, D.J., and Cullen, P.J.** (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J. Cell Biol.* **181**: 1073–1081.
- Valenzuela, L., Aranda, C., and González, A.** (2001). TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* **183**: 2331–2334.
- Varelas, X. and Wrana, J.L.** (2012). Coordinating developmental signaling: Novel roles for the Hippo pathway. *Trends Cell Biol.* **22**: 88–96.
- Van De Velde, S. and Thevelein, J.M.** (2008). Cyclic AMP-protein kinase A and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**: 286–293.
- Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., and Delvaux, F.R.** (2004). Glucose and sucrose: Hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotechnol.* **22**: 531–537.
- Verstrepen, K.J. and Klis, F.M.** (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* **60**: 5–15.
- Vinod, P.K., Sengupta, N., Bhat, P.J., and Venkatesh, K. V.** (2008). Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of *FLO11*. *PLoS One* **3**: e1663.
- Vyas, V.K., Kuchin, S., Berkey, C.D., and Carlson, M.** (2003). Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 1341–1348.

- Vyas, V.K., Kuchin, S., and Carlson, M.** (2001). Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **158**: 563–572.
- Wang, Y. and Dohlman, H.G.** (2006). Pheromone-regulated sumoylation of transcription factors that mediate the invasive to mating developmental switch in yeast. *J. Biol. Chem.* **281**: 1964–1969.
- Wang, Y., Irgeba, A.A., Ayalew, M., and Suntay, K.** (2009). Sumoylation of transcription factor Tec1 regulates signaling of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast. *PLoS One* **4**: e7456.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., and Garrett, S.** (1995). *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6854–6863.
- Wedaman, K.P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., McCaffery, J.M., and Powers, T.** (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**: 1204–1220.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., and Bauer, J.C.** (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119–123.
- Weisser, S.** (2011). Analysis of the signal processing dynamics by the Fus3/Kss1-MAPK module in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Weisser, S.** (2009). *In vivo* Quantifizierung der Fus3/Kss1-MAPK-Modul-Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Wek, R.C., Jackson, B.M., and Hinnebusch, A.G.** (1989). Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 4579–4583.
- White, J.M. and Rose, M.D.** (2001). Yeast mating: Getting close to membrane merger. *Curr. Biol.* **11**: 16–20.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P., and MacKay, V.L.** (1989). The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**: 467–477.
- Whiteway, M.S. and Thomas, D.Y.** (1994). Site-directed mutations altering the CAAX box of Ste18, the yeast pheromone-response pathway G gamma subunit. *Genetics* **137**: 967–976.
- Whiteway, M.S., Wu, C., Leeuw, T., Clark, K., Fourest-Lieuvin, A., Thomas, D.Y., and Leberer, E.** (1995). Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572–1575.

- Wilkinson, L.E. and Pringle, J.R.** (1974). Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating type alpha by a factor produced by cells of mating type a. *Exp. Cell Res.* **89**: 175–187.
- Wishart, J.A., Hayes, A., Wardleworth, L., Zhang, N., and Oliver, S.G.** (2005). Doxycycline, the drug used to control the tet-regulatable promoter system, has no effect on global gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 565–569.
- Wissmann, A., Baumeister, R., Müller, G., Hecht, B., Helbl, V., Pfeleiderer, K., and Hillen, W.** (1991). Amino acids determining operator binding specificity in the helix-turn-helix motif of Tn10 Tet repressor. *EMBO J.* **10**: 4145–4152.
- Wray, L. V., Jorgensen, R.A., and Reznikoff, W.S.** (1981). Identification of the tetracycline resistance promoter and repressor in transposon Tn10. *J. Bacteriol.* **147**: 297–304.
- Wu, C., Leberer, E., Thomas, D.Y., and Whiteway, M.** (1999). Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10**: 2425–2440.
- Wu, J., Duggan, A., and Chalfie, M.** (2001). Inhibition of touch cell fate by *egl-44* and *egl-46* in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**: 789–802.
- Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.-M., and Chambon, P.** (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**: 551–568.
- Xue, Y., Batlle, M., and Hirsch, J.P.** (1998). *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G(alpha) subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* **17**: 1996–2007.
- Yang, R., Wek, S.A., and Wek, R.C.** (2000). Glucose limitation induces *GCN4* translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2706–2717.
- Yang, X., Jiang, R., and Carlson, M.** (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* **13**: 5878–5886.
- Yoshida, T.** (2008). MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**: 8–17.
- Yuan, Y.-L. and Fields, S.** (1991). Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5910–5918.
- Yuan, Y.O., Stroke, I.L., and Fields, S.** (1993). Coupling of cell identity to signal response in yeast: Interaction between the alpha 1 and STE12 proteins. *Genes Dev.* **7**: 1584–1597.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R.** (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 27–81.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R., and Young, R.A.** (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**: 395–404.

- Zeller, C.E., Parnell, S.C., and Dohlman, H.G.** (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein β subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J. Biol. Chem.* **282**: 25168–25176.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.-L.** (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **13**: 877–883.
- Zhao, Z.-S., Leung, T., Manser, E., and Lim, L.** (1995). Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator *CDC24*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5246–5257.
- Zheng, C.-F. and Guan, K.-L.** (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* **13**: 1123–1131.
- Zheng, W., Zhao, H., Mancera, E., Steinmetz, L.M., and Snyder, M.** (2010). Genetic analysis of variation in transcription factor binding in yeast. *Nature* **464**: 1187–91.
- Zhou, Z., Gartner, A., Cade, R., Ammerer, G., and Errede, B.** (1993). Pheromone-induced signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2069–2080.
- Zhu, C. et al.** (2009). High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res.* **19**: 556–566.
- Zhu, H., Klemic, J.F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K.G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M.A., and Snyder, M.** (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* **26**: 283–289.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i>	2
Abb. 2: Signalwege zur Kontrolle der <i>FLO11</i> -Expression.....	5
Abb. 3: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Ste12.....	15
Abb. 4: Die Familie der TEA-Transkriptionsfaktoren.....	16
Abb. 5: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Tec1.....	19
Abb. 6: Mechanismen zur Kontrolle der Expression von Konjugations- und Adhäsions- spezifischen Genen.	20
Abb. 7: Das duale Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem für <i>S. cerevisiae</i>	22
Abb. 8: PREs und TCS-Elemente im <i>TEC1</i> -Promotor.....	24
Abb. 9: <i>In vitro</i> Interaktion von Tec1 und Ste12 mit den <i>TEC1</i> -Promotorvarianten.	27
Abb. 10: Bestimmung der Flo11-abhängigen Adhäsion an Agar mittels Waschtest.....	29
Abb. 11: Der Ste12-abhängige Regelkreis vermittelt die Pheromon-abhängige <i>TEC1</i> -Expression.....	30
Abb. 12: Die <i>FLO11</i> -Expression ist abhängig von Tec1 und wird negativ durch Pheromon beeinflusst.	31
Abb. 13: Ste12 ist wichtig für die Expression eines <i>P_{TEC1}-CFP*</i> -Reportergens.	33
Abb. 14: Quantifizierung der <i>P_{TEC1}-CFP*</i> -Reportergen-Expression unter Konjugationsbedingungen in An- und Abwesenheit von <i>TEC1</i> und <i>STE12</i>	34
Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopie der verschiedenen <i>P_{TEC1}-3 × mTurquoise 2*</i> -Reportergene unter Konjugationsbedingungen in An- und Abwesenheit von <i>TEC1</i> und <i>STE12</i>	36
Abb. 16: Quantifizierung der <i>P_{TEC1}-3 × mTurquoise 2*</i> -Reportergen-Expression unter Konjugations- bedingungen in An- und Abwesenheit von <i>TEC1</i> und <i>STE12</i>	37
Abb. 17: Pheromon-induzierter Zellzyklusarrest in Stämmen mit <i>3 × mTurquoise 2*</i> - und <i>CFP*</i> - Reportergenen.....	38
Abb. 18: Aktivierung transkriptioneller Reportergene durch Pheromon.....	39
Abb. 19: Die Expression von <i>TEC1</i> wird durch Glukosemangel induziert und ist unabhängig von der Bindung von Tec1 und Ste12 an den <i>TEC1</i> -Promotor.	41
Abb. 20: Die Expression von <i>FLO11</i> wird durch Glukosemangel induziert und Tec1 und Ste12 werden für die volle Aktivierung benötigt.....	42
Abb. 21: Die <i>TEC1</i> -Transkript- und Tec1-Proteinmengen werden unabhängig von der Bindung von Tec1 und Ste12 an den <i>TEC1</i> -Promotor antagonistisch durch Stickstoffmangel reguliert. ..	44
Abb. 22: Einfluss von Stickstoffmangel auf die Expression von <i>FLO11</i>	45
Abb. 23: Bestimmung der Tec1-Proteinmengen in diploiden <i>P_{TEC1}</i> -Mutanten.	46
Abb. 24: Die PRE-vermittelte Kontrolle der <i>TEC1</i> -Expression ist wichtig für die Biofilmbildung.	47
Abb. 25: Die Tec1-Proteinmenge wird negativ durch 3-AT beeinflusst.	48
Abb. 26: Die <i>TEC1</i> -Expression wird nicht durch NaCl beeinflusst.	50
Abb. 27: Einfluss von NaCl auf die Expression von <i>FLO11</i>	51

Abb. 28: Einfluss einer C-terminalen YFP-Markierung auf die translationelle Regulation von <i>TEC1</i>	52
Abb. 29: Vergleich der CEN-basierten <i>P_{CMV}-rtTA</i> -vermittelten, Doxyzyklin-abhängigen <i>TEC1</i> -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten.	54
Abb. 30: <i>P_{CMV}-rtTA</i> -vermittelte, Doxyzyklin-abhängige <i>TEC1</i> -Expression in einem <i>S. cerevisiae</i> -Stamm mit einer einzelnen tet-Operatorsequenz im <i>TEC1</i> -Promotor.....	55
Abb. 31: <i>P_{STE12}-rtTA</i> -vermittelte, Doxyzyklin-abhängige <i>TEC1</i> -Expression in einem <i>S. cerevisiae</i> -Stamm mit einer einzelnen tet-Operatorsequenz im <i>TEC1</i> -Promotor.....	58
Abb. 32: Orientierung der PREs und PRE-ähnlichen Elemente im <i>TEC1</i> -Promotor.	62
Abb. 33: Kontrolle der <i>TEC1</i> -Expression durch die Transkriptionsfaktoren Ste12, Tec1 und Phd1. ..	64
Abb. 34: Modell der Tec1-Regulation.	71
Abb. 35: Beispiel eines zur Quantifizierung verwendeten Makros.	124

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei...

- ... Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Bereitstellung des Projekts, die vielen wertvollen Anregungen und hilfreichen Tipps.
- ... Prof. Dr. Peter Lenz für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
- ... Prof. Dr. Torsten Waldminghaus und Prof. Dr. Uwe Maier für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.
- ... Prof. Dr. Peter Lenz außerdem gemeinsam mit Konstanze Bandmann für die gute Zusammenarbeit.
- ... dem DFG-Graduiertenkolleg 1216 und der synmikro-Graduiertenschule für die finanzielle Unterstützung, die Möglichkeit an nationalen und internationalen Workshops und Tagungen teilnehmen zu können, sowie die zahlreichen neuen Bekanntschaften.
- ... Dr. Stefan Brückner und Dr. Christof Taxis für jede Menge nützlicher Ratschläge und Tipps.
- ... Sarah S., Julia und Sandra für ein stets offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen sowie ihre aufmunternden Worte.
- ... Christian Renicke für die unzähligen hilfreichen Anregungen, Tipps und Tricks rund um die Laborarbeit und diverse PC-Software, die aufopferungsvolle Hilfe bei Problemen jeglicher Art und fürs „Korrekturlesen“ der Abbildungen.
- ... meinen ehemaligen Bachelor-Studentinnen Sandra Fries und Nina Garben für die Unterstützung bei meinen Projekten.
- ... allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Mösch und AG Bölker für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die kurzweiligen Mittagspausen, die zahlreichen Spiele- und DVD-Abende, spannende Krimidinner und schönen Weihnachtsfeiern.
- ... Sarah S., Julia, Didi und Nina für die Motivation und Unterstützung, wenn es mit den Experimenten mal wieder nicht so lief, wie es sollte, ihre Hilfsbereitschaft, gute Ratschläge für alle Lebenslagen und für eine wirklich sehr lustige gemeinsame Zeit.
- ... meinen fleißigen Korrekturleserinnen Anne, Katja, Sarah M. und Sarah S.
- ... meiner Freundin Emöke fürs Aufbauen, Unterstützen und eine großartige gemeinsame Zeit hier in Marburg.
- ... der Montagsgruppe Anja, Christian M., Christian O. und Sarah S. zusammen mit Katja und Sabrina für viele schöne gemeinsame Stunden.
- ... last but not least bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Schwester dafür, dass sie immer für mich da sind und an mich glauben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Analyse und Dynamik der regulatorischen Schaltkreise des TEA-Transkriptionsfaktors Tec1 in *Saccharomyces cerevisiae*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Sarah Weissner)

Lebenslauf

Die Seite 159 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.